

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Untersuchung zur Expression von Interleukin 7, Interleukin 8  
und Interleukin 15 an der Plazenta bei  
Gestationsdiabetes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sophia Pritz

aus Bonn

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank  
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Christian Kellner

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Stefan Hutter

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2020

Meiner Mutter.





**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Gestationsdiabetes .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Screening und Diagnostik .....	3
1.1.3	Folgen für die Mutter .....	7
1.1.4	Folgen für das Kind.....	8
1.1.5	Pathophysiologie Diabetes mellitus .....	10
1.1.6	Therapie.....	12
1.2	Plazenta.....	14
1.2.1	Aufbau und Entstehung .....	14
1.2.2	Transport und metabolische Funktion.....	15
1.2.3	Endokrine Funktion.....	17
1.2.4	Immunologische Funktion.....	18
1.3	Interleukine .....	20
1.3.1	Interleukin 7 .....	20
1.3.2	Interleukin 8 .....	21
1.3.3	Interleukin 15 .....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1	Studiendesign.....	23
2.2	Immunhistochemie .....	24
2.2.1	Herstellung der Paraffinschnitte .....	24
2.2.2	Antikörper .....	24
2.2.3	Nachweismethode .....	25
2.2.4	Immunhistochemische Färbung .....	26
2.2.5	Lichtmikroskopische Auswertung.....	27
2.3	Immunfluoreszenz .....	28

## Inhaltsverzeichnis

2.4	Statistische Auswertung .....	29
2.5	Material.....	30
2.5.1	Geräte .....	30
2.5.2	Chemikalien .....	31
2.5.3	Antikörper .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Interleukin 7.....	33
3.1.1	IL-7 GDM vs. Kontrolle.....	33
3.1.2	IL-7 weiblich vs. männlich.....	34
3.2	Interleukin 8.....	37
3.2.1	IL-8 GDM vs. Kontrolle.....	37
3.2.2	IL-8 weiblich vs. männlich.....	38
3.3	Interleukin 15.....	41
3.3.1	IL-15 GDM vs. Kontrolle.....	41
3.3.2	IL-15 weiblich vs. männlich.....	42
3.4	Immunfluoreszenz .....	45
3.5	Zusammenfassung Ergebnisse.....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	GDM und Inflammation .....	50
4.1.1	Insulinresistenz und IL-8.....	51
4.1.2	Inflammation und IL-7 .....	53
4.1.3	Erfolgreiche Schwangerschaft und IL-15 .....	54
4.1.4	Insulintoleranz auf zellulärer Ebene.....	55
4.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>82</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Gestationsdiabetes

Der Gestationsdiabetes mellitus (GDM) ist definiert als „Glucosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75-g oralen Glucosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und qualitätsgesicherter Glucosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert wird.“[1]

Aus dieser Definition heraus ist nicht zu unterscheiden, ob es sich bei einer vorliegenden Glucosetoleranzstörung tatsächlich um eine schwangerschaftsassozierte Störung oder eine bereits präkonzeptionell bestehende Erkrankung im Sinne eines Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 handelt. Demnach bedarf jede Form einer ausgeprägten Glucosetoleranzstörung der Beobachtung und Intervention, seien es diätetische oder medikamentöse Maßnahmen, da sowohl für Mutter, als auch Kind zum Teil gravierende kurzfristige, sowie langfristige gesundheitliche Folgen drohen.

Die WHO hat es sich zum Ziel gesetzt, die Häufigkeit von Diabetesfolgen als relevantes Gesundheitsrisiko wie Schwangerschaftskomplikationen, Amputationen, Blindheit und Nierenversagen bis zum Jahr 2020 um ein Drittel zu senken [2]. Umso bedeutender ist es, das Risikoprofil und die Pathogenese dieser Erkrankung zu verstehen und somit die Behandlung und die Prävention zielgerichtet steuern zu können.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz des GDM ist abhängig von vielzähligen Faktoren. Es zeigte sich eine unterschiedliche Häufigkeit in verschiedenen ethnischen Gruppen, wie Kaukasierinnen, Hispanierinnen, Asiatinnen oder Afrikanerinnen, wobei das Risiko an einem GDM zu erkranken für Asiatinnen, Hispanierinnen und Afrikanerinnen höher ist, als bei Kaukasierinnen [3, 4]. Von entscheidender Bedeutung ist aber die Prävalenz von Risikofaktoren für GDM bzw. der genetischen Vorbelastung für Diabetes mellitus innerhalb der Schwangeren einer Population. Genauso haben natürlich das verwendete Screeningverfahren zur De-

tektion betroffener Patientinnen (Frühschwangerschaft vs. Spätschwangerschaft; Urinprobe vs. Venöses Plasma; 50g Glucose-Screeningtest vs. 75g oGTT) und nicht zuletzt die zugrunde gelegten Grenzwerte großen Einfluss auf die dadurch im internationalen Vergleich stark schwankende Prävalenz dieser Erkrankung [1].

In Deutschland wurde im Jahr 2016 laut dem Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen bei 40.648 von 758.783 registrierten Schwangerschaften ein GDM diagnostiziert.

Das entspricht einer Prävalenz von 5,38% und steigt somit, nach einer davor bestehenden Phase der Stagnation zwischen 2011 und 2014, wie bereits von 2002-2010 erneut an. Die Prävalenz eines bereits präkonzeptionell erworbenen Diabetes mellitus (Typ 1 und 2 zusammengefasst) bleibt im Beobachtungszeitraum hingegen nahezu konstant [5, 6]. Seit 2012 ist das Screening des GDM in den Mutterpass implementiert worden und somit fester Bestandteil der Vorsorgeuntersuchungen bei Schwangeren.

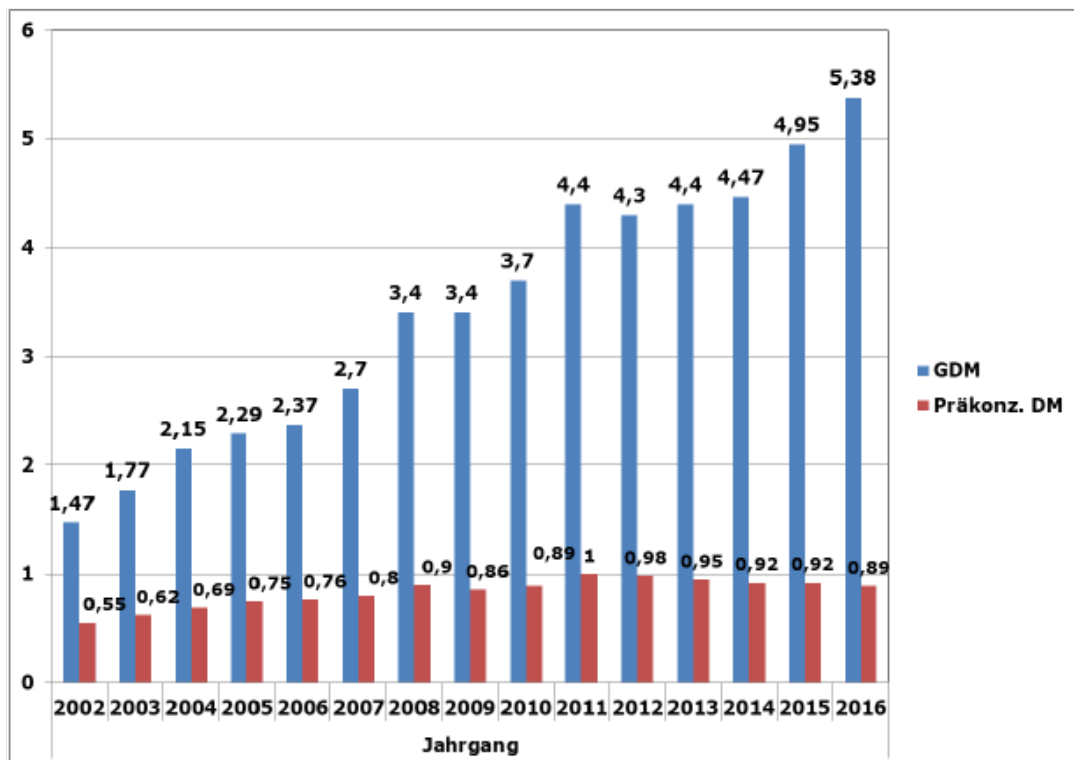


Abbildung 1: Relative Häufigkeit des GDM/DM Typ 1 und 2 in % in Deutschland 2002-2016 nach [6]

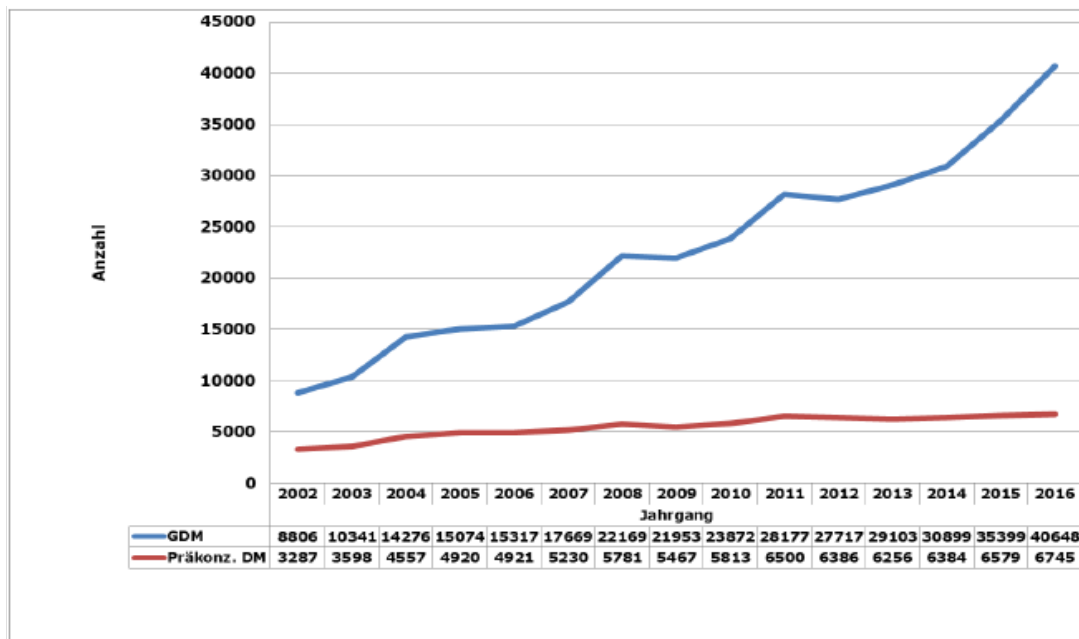


Abbildung 2: Absolute Häufigkeiten GDM/DM Typ 1 und 2 in Deutschland 2002-2016 nach [6]

### 1.1.2 Screening und Diagnostik

Eine Schwangerschaft ist physiologischerweise begleitet von einer Reihe hormoneller und metabolischer Veränderungen. Während die Frühschwangerschaft als anaboler Zustand zu betrachten ist [7], in dem Nährstoffe gespeichert werden, die Insulinproduktion steigt und die Insulinsensitivität konstant bleibt, oder sogar leicht ansteigt [8], ist ab der 2. Schwangerschaftshälfte von einem zunehmend katabolen Zustand auszugehen [7]. Nährstoffdepots werden abgebaut und die periphere Insulinresistenz nimmt zu, während die hepatische Glukosebereitstellung steigt [9], alles im Sinne der optimalen Versorgung des Feten.

Bei Patientinnen mit GDM besteht ein Defizit zwischen der Insulinproduktion und der zunehmenden Insulinresistenz. Um Folgeschäden bei Mutter und Kind zu vermeiden, ist eine frühe Diagnostik und adäquate Therapie der diabetogenen Stoffwechsellage anzustreben. Seit März 2012 ist der Entschluss des Bundesministeriums für Gesundheit, ein Screening auf GDM bei allen Schwangeren gemäß der Leitlinie der Deutschen Diabetesgesellschaft durchzuführen, in Kraft getreten und seither in den gesetzlichen Mutterschaftsrichtlinien imple-

mentiert [10]. Ein optimales Screeningverfahren sollte immer eine hohe Sensitivität, sowie Spezifität aufweisen, dabei leicht durchführbar sein und bestenfalls keine zu hohen Kosten verursachen. Laut Empfehlungen der Deutschen Diabetesgesellschaft scheiden die Bestimmung der Nüchternblutglucose aufgrund uneinheitlicher Grenzwerte und damit verbundener schwankender Spezifität, sowie die Bestimmung der Gelegenheits-Blutglucosewerte, der Uringlucose, des HbA1c und des Fructosamins aufgrund mangelnder Sensitivität als generelle Screeningverfahren aus [1]. Einzig der Glucose Challenge Test oder auch 50g-Glucose-Screeningtest weist ein akzeptables Verhältnis zwischen Spezifität und Sensitivität auf, wodurch es im Rahmen eines zweizeitigen Screeningverfahrens in Kombination mit dem 75g oralen Glucose Toleranztest (oGTT) in Deutschland etabliert ist. Hierbei wird eine Lösung aus 200ml Wasser und 50g Glucose unabhängig von Tageszeit und letzter Nahrungsaufnahme aufgenommen, die Glucosebestimmung erfolgt 1 Stunde nach Beenden des Trinkens im venösen Plasma. Ab einem Wert von  $\geq 201$  mg/dl (11,1 mmol/l) gilt die Diagnose eines GDM als sicher, bei Werten  $\geq 135$  mg/dl (7,5 mmol/l) sollte im Rahmen der zweizeitigen Testung ein 75g oGTT folgen [11]. Bei Patientinnen mit hohem Risikoprofil (vorangegangener GDM, familiäre Diabetesbelastung, nicht-nordische Herkunft, Gewicht  $>90$  kg, BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, Alter  $\geq 25$  Jahre [12]) ist ein Vortest obsolet und es sollte, um Doppeltestung zu vermeiden, von vornherein der Goldstandard der Diabetes-Testung, der 75g oGTT durchgeführt werden [1].

Hierbei wird nach Bestimmung des Nüchternblutglucosewertes eine Lösung aus 300ml Wasser mit 75g Glucose über 3-5min getrunken und anschließend nach 1 und nach 2 Stunden die Glucose im Plasma bestimmt.

Der Test sollte unter Standardbedingungen stattfinden.

Als Standardbedingungen gelten: keine akuten Erkrankungen; keine Blutzucker-steigernde Medikation; keine körperliche Anstrengung vor oder während des Tests; individuell normale Essgewohnheiten in den vorherigen 3 Tagen (also keine bewussten Einschränkungen, z.B. in der Kohlenhydrataufnahme); Einhalten einer Nüchternperiode von mindestens 8h; Testbeginn zwischen 6-9 Uhr morgens, aufgrund physiologischer Blutzuckerschwankungen im Tagesverlauf [1]. Die International Association of Diabetes and Pregnancy Study

Groups (IADPSG) empfiehlt als anzuwendende Grenzwerte einen Nüchternblutzucker von  $<92$  mg/dl (5,1 mmol/l), einen 1h-Blutzuckerwert von  $<180$  mg/dl (10 mmol/l) und einen 2h-Blutzuckerwert von  $<153$  mg/dl (8,5 mmol/l) als Diagnosekriterium für einen GDM. Ein 2-fach ermittelter Nüchternblutzucker von  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l), sowie ein 2h-Wert  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) gelten als Beweis für einen manifesten Diabetes mellitus [13].

Bei der Diagnostik des GDM wird zwischen Früh- ( $<24$  SSW) und Spätschwangerschaft ( $\geq 24$  SSW) unterschieden. Bei Vorstellung in der Frühschwangerschaft sollen vor allem Patientinnen mit Risikofaktoren (siehe Flussdiagramm) auf einen bisher nicht entdeckten Diabetes mellitus hin untersucht werden [13].

Hierbei gibt es zwei Vorgehensweisen. Es wird eine Gelegenheits-Glucosebestimmung, also unabhängig vom Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme, durchgeführt. Liegt der Wert bei  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) folgt als Zweitmessung die Bestimmung der Nüchtern-Glucose. Liegt der Wert zwischen 140-199 mg/dl (7,8-11,05 mmol/l) sollte eine Zweitmessung oder der 75g oGTT folgen. Alternativ kann von vornherein eine Nüchtern-Glucosebestimmung durchgeführt werden. Liegt der Plasmawert hier bei  $\geq 92$  mg/dl (5,1 mmol/l) erfolgt eine nochmalige Durchführung des Tests. Die Deutsche Diabetesgesellschaft hat dazu folgendes Diagramm erstellt:

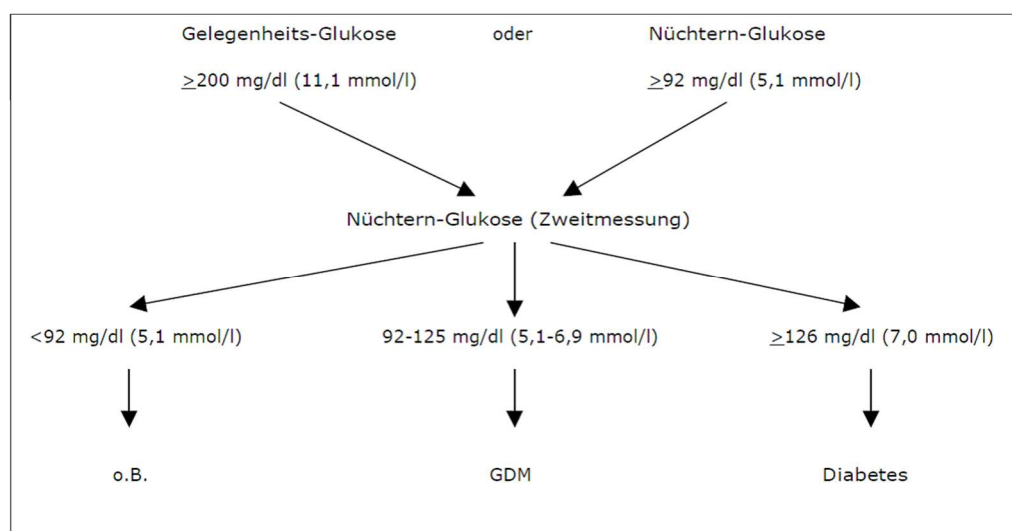


Abbildung 3: Flussdiagramm bei erhöhten Blutglucosewerten in der Frühschwangerschaft[1]



Zwischen der 24+0 und 27+6 SSW sollte bei allen Schwangeren der 75g-oGTT durchgeführt werden [13] und nach folgendem Flussdiagramm vorgegangen werden:

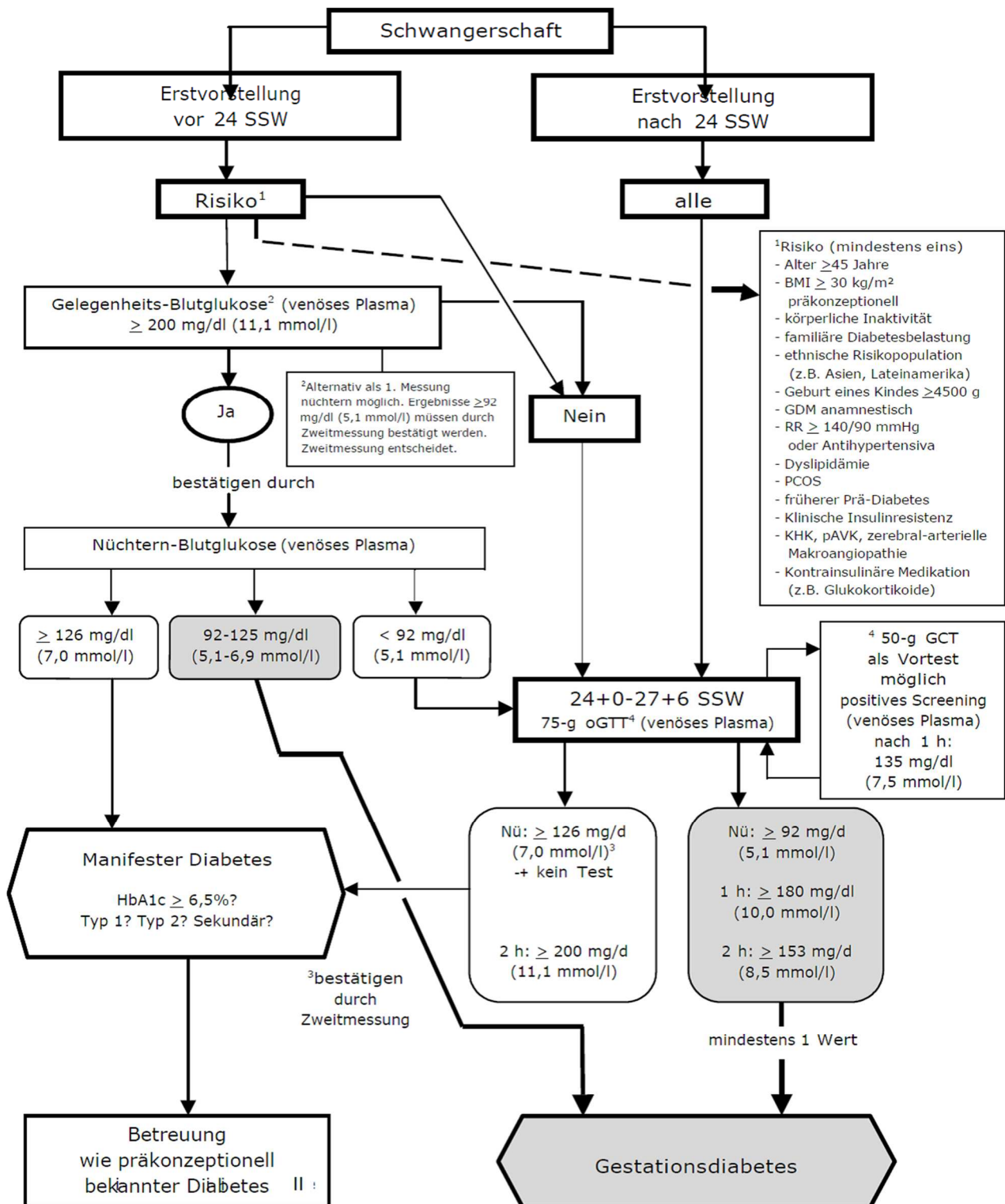


Abbildung 4: Flussdiagramm Diagnostik Hyperglycämie in der Schwangerschaft [1]

### 1.1.3 Folgen für die Mutter

Gestationsdiabetes unterliegt sowohl in der Pathogenese, als auch die unmittelbaren Folgen betreffend, einem sehr komplexen und multifaktoriellen Entstehungsprozess, der geprägt ist von vielen variablen Confoundern, wie einem evtl. präkonzeptionell bestehenden unbekannten Diabetes mellitus, Übergewicht, arterieller Hypertonie, dem oftmals höheren Alter der Mutter oder auch diätetischen Veränderungen während der Schwangerschaft [14, 15]. Diese Confounder sowie auch das Bias durch das versorgende Personal, je nach Kenntnisstand der Diagnose eines GDM unterschiedliche Behandlungsstrategien zu verfolgen (frühzeitiger Kaiserschnitt, prophylaktische Versorgung des Neugeborenen auf einer Intensiveinheit) stehen im Verdacht, Einfluss auf einige der primären oder sekundären Endpunkte der Studien zu haben [16].

Generell muss bei einem GDM zwischen akut prä- oder perinatal auftretenden Problemen und Langzeitfolgen unterschieden werden.

Vermutlich aufgrund der Glucosurie konnte ein vermehrtes Auftreten von Harnwegsinfekten und Candidainfektionen nachgewiesen werden [17]. Verschiedene Studien konnten im Zusammenhang mit GDM ein erhöhtes Risiko für hypertensive Störungen, wie arterielle Hypertonie, Präeklampsie oder Eklampsie [18-20], eine erhöhte Rate an Frühgeburtlichkeit (<37.SSW), Schulterdystokien, Kaiserschnitten [15], Dammrissen Grad III und IV bis zu schweren postpartalen Blutungen [21] und als Langzeitfolge einen manifesten Diabetes mellitus [22] nachweisen. Wie eingangs bereits erwähnt, unterliegen diese Folgen allerdings verschiedenen potentiellen Ursachen. So kommt es beispielsweise bei den hypertensiven Störungen und GDM zu Überlappungen. Beide Störungen sind assoziiert mit Insulinresistenz, Inflammation und dem mütterlichen Fettverteilungsmuster [23]. Gleichzeitig können hypertensive Entgleisungen, sowie die durch die Hyperglycämie bedingte Makrosomie des Kindes zu einer verfrüht notwendigen Einleitung oder auch spontan einsetzenden Geburt führen [24]. Ebenso kann die erhöhte Prävalenz von Infektionen, wie o.g. Harnwegsinfekte ursächlich für die Frühgeburtlichkeit sein. Ähnlich verhält es sich mit der erhöhten Rate für Kaiserschnitte bei Patientinnen mit GDM [15].

Studien konnten allerdings nachweisen, dass nicht zwingend die Makrosomie des Kindes, die bei behandelten GDM Patientinnen seltener auftritt, sondern die Diagnose GDM zu einer zum Teil 2-fach höheren Rate an Kaiserschnitten führt [25, 26].

Eine gefürchtete Langzeitfolge des GDM ist das Auftreten eines manifesten Diabetes mellitus [27]. Je nach Studie liegt die Inzidenz in Europa zwischen 11-53%, abhängig vom Zeitpunkt der postpartalen Reevaluation, des Schweregrades des GDM, sowie dem Vorhandensein weiterer Risikofaktoren [28-31]. Insgesamt ist das Risiko für Frauen nach einem GDM in den darauffolgenden 10 Jahren an einem T2DM zu erkranken 7-10fach erhöht, ca. 20 % weisen 1 Jahr postpartum Glucosetoleranzstörungen in unterschiedlichen Schweregraden auf [11]. Das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 scheint beeinflusst zu sein durch den präkonzeptionellen BMI, die Gewichtszunahme postnatal, eine positive Familienanamnese, erhöhte Nüchtern- und Toleranztestwerte während und nach der Schwangerschaft, Zeitpunkt der Diagnose in der Schwangerschaft (je früher, umso höher das spätere Diabetesrisiko) und die Notwendigkeit einer pharmazeutischen Therapie in der Schwangerschaft [29, 31, 32].

Die Prävalenz eines Diabetes mellitus Typ 1 1-10 Jahre nach einer Schwangerschaft mit GDM liegt je nach Studie bei 2-9% [28, 29] und kann für gewöhnlich bereits frühzeitig durch den Nachweis von Autoantikörpern vermutet werden [31, 33-35].

Durch den Diabetes mellitus haben diese Patientinnen ein erheblich gesteigertes Risiko für mikro- und makrovaskuläre Erkrankungen, wie Herzinfarkte, Schlaganfälle, Nephropathien und Retinopathien [36, 37].

#### 1.1.4 Folgen für das Kind

Die meisten der oben genannten akuten Folgen des GDM für die Mutter gelten gewissermaßen natürlich ebenso für das Kind, wie die erhöhten Raten für Frühgeburtlichkeit, Schulterdystokien und Kaiserschnitte.

Bereits 1952 postulierte Jorgen Pedersen die Hypothese, dass die maternale Hyperglycämie zur fetalen Hyperglycämie führt und es dadurch zu einer Hy-

hypertrophie der fetalen pankreatischen Inselzellen mit einer daraus resultierenden Insulinhypersekretion kommt [38], nachgewiesen durch ein erhöhtes C-Peptid aus perinatal entnommenem Nabelschnurblut. [15] Aus dieser Annahme resultiert die erhöhte Glucoseverwertung durch das Kind, sowie die erhöhte Insulinsekretion, das im Sinne eines Wachstumshormons auf Muskel- und Fettgewebe wirkt und dadurch zu einer kindlichen Makrosomie führt [38]. Laut einer großen Studie werden 19,9% der Kinder von Müttern mit GDM als Large for Gestational Age, also oberhalb der 90. Perzentile geboren [39]. Ein erhöhtes Geburtsgewicht kann wiederum Einfluss auf einen verfrühten Geburtstermin, die Kaiserschnitttrate, oder das Auftreten von Schulterdystokien haben [39]. Des Weiteren führt die Makrosomie über einen gesteigerten Stoffwechsel und damit einhergehenden Sauerstoffbedarf zu einer vermehrten Bildung von EPO mit Polyglobulie [40]. Eine fetale Hyperglycämie kann zu einem gesteigerten Trinkverhalten und Polyurie mit daraus folgendem Polyhydramnion führen, was wiederum eine Frühgeburt zur Folge haben kann [41].

Die Makrosomie bedeutet zwar ein großes, in der Entwicklung aber dennoch möglicherweise unreifes Kind, mit einer Unreife von Lunge und Leber [42, 43], bis hin zum ARDS (acute respiratory distress syndrome) des Neugeborenen [44].

Eine weitere gefürchtete postpartale Komplikation sind Hypoglycämien beim Neugeborenen [15] aufgrund des Wegfalls der konstant hohen Glucosezufuhr über die Nabelschnur, bei zunächst weiterhin erhöhter Insulinproduktion [44]. Infolge engmaschiger Kontrollen vor allem bei Neugeborenen von Müttern mit GDM ist das Auftreten schwerer Hypoglycämien selten geworden [15].

Als Langzeitfolgen drohen bei den Kindern ebenfalls Übergewicht, die Entwicklung eines Diabetes mellitus und bei Mädchen das gehäufte Auftreten von GDM in eigenen zukünftigen Schwangerschaften [45-47].

Der genaue Mechanismus, wie das erhöhte Risiko für die o.g. Langzeitfolgen auf das Kind übertragen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird zunehmend untersucht, in wie weit die Exposition gegenüber der diabetogenen Stoffwechsellage den Fetus bereits in utero prägt, im Sinne epigenetischer Einflüsse [48]. Diese Einflüsse unterliegen einer fortschreitenden Dynamik, je nach Ausprägung der Insulinresistenz [49].

Es sollten also jegliche Ausprägungen einer Glucosetoleranzstörung in der Schwangerschaft frühzeitig behandelt werden, um epigenetische Veränderungen und die daraus folgenden Langzeitfolgen für das Kind zu vermeiden.

Die Entstehung eines T2DM bei Kindern scheint insgesamt ein multifaktorieller Prozess zu sein, bei dem bisher die Einflüsse aus maternalem Metabolismus, Epigenetik und kindlichem Übergewicht bzw. den Folgen eines ungesunden Lebensstils kaum voneinander zu trennen sind [50].

### 1.1.5 Pathophysiologie Diabetes mellitus

In der Schwangerschaft unterliegt der Metabolismus der Schwangeren vielfältigen physiologischen Veränderungen, beeinflusst vor allem durch hormonelle, aber auch immunologische Faktoren. Im Sinne der sich entwickelnden Frucht, werden vermehrt Nährstoffdepots angelegt und im weiteren Verlauf der Schwangerschaft für den Fetus mobilisiert. Zur Gewährleistung dieses Mechanismus ist hierbei eine physiologische Insulinresistenz nötig, die sicherstellt, dass dem Fetus ausreichend Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden und nicht bereits durch den mütterlichen Stoffwechsel metabolisiert werden.

Der GDM stellt aber eine pathologisch entglittene Form dieses Zustandes dar und ähnelt in der Pathophysiologie stark dem Diabetes mellitus.

Diabetes mellitus entsteht entweder aufgrund eines absoluten, oder eines relativen Insulinmangels im Sinne einer erhöhten peripheren Insulinresistenz. Die gängige Klassifikation des Diabetes unterscheidet zwischen dem autoimmun verursachten Insulinmangel beim Typ 1 und der Adipositas-assoziierten Insulinresistenz beim Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), sowie dem Gestationsdiabetes als Sonderform [51]. In der Klinik bestehen allerdings vielfältige Überlappungen und es zeigt sich, dass es kein zuverlässiges klinisches Symptom oder diagnostisches Kriterium gibt, das eine zuverlässige Unterscheidung der Formen zulässt [52]. Heutzutage wird einerseits Typ 2 Diabetes mellitus in immer jüngeren Jahren und einhergehend mit einem Untergang der  $\beta$ -Zell-Inseln des Pankreas diagnostiziert, andererseits steigt gleichzeitig die Inzidenz eines erhöhten Body Mass Index, sowie einer nachgewiesenen Insulinresistenz bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus [53].

	<b>Diabetes mellitus Typ 1</b>	<b>Diabetes mellitus Typ 2</b>
<b>Alter bei Erstmanifestation</b>	v.a. Kinder- und Jugendalter, kann aber in jedem Alter auftreten	Gewöhnlich assoziiert mit höherem Alter; die Prävalenz bei jüngeren Personen ist steigend
<b>Insulinmangel</b>	absolut	Relativ zur jeweiligen Insulinresistenz
<b>Risikofaktoren</b>	Genetisch*, Übergewicht, Insulinresistenz	Genetisch*, Übergewicht, Insulinresistenz
<b>Insulitis</b>	autoimmun	Autoinflammatorisch
<b>Autoantikörper</b>	In 85-90% d.F. vorhanden	Möglicherweise vorhanden
<b>Behandlung</b>	Insulintherapie	Diät, Bewegung, orale Antidiabetika, Insulin

\*sowohl Typ 1, als auch T2DM haben eine genetische Komponente als Ursache, allerdings wurden unterschiedliche Gene identifiziert

*Abbildung 5: Vergleich Charakteristika assoziiert mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus nach[54]*

Traditionell wurde bisher strikt zwischen dem körpereigenen Metabolismus, dessen Aufgabe die Verwertung von Nährstoffen ist und dem Immunsystem, zur Abwehr von körperfremden Schadstoffen, Mikroorganismen oder auch kanzerogenen Einflüssen unterschieden. Klinisch werden aber viele Interaktionen zwischen beiden Systemen beobachtet, wie Ernährung das Immunsystem, aber auch Entzündungsreaktionen den Stoffwechsel beeinflussen [52]. Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus haben Studien erhöhte Serumwerte von Akute-Phase-Proteinen, wie C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin, Fibrinogen und Zytokinen, wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) beschrieben [55, 56].

Als Folge der chronischen Entzündung zeigen die Inselzellen des Pankreas von Patienten mit Typ-2 Diabetes häufig fibrotische Veränderungen, sowie Amyloidablagerungen, die einerseits den Untergang der  $\beta$ -Zellen induzieren und andererseits zur Aufrechterhaltung der Entzündung beitragen [57].

Weitere klassische Mechanismen der Entzündungsreaktion, wie Hypoxie und Apoptose werden als mitwirkende Ursachen in der Entstehung von Diabetes mellitus vermutet. So konnte beispielsweise am adipösen Mausmodell eine zunehmende Hypoxie im schnell wachsenden Fettgewebe beobachtet werden.

Bedingt durch die Hypoxie zeigte sich eine Abnahme der Glucose-, sowie Fettsäureaufnahme in den Adipozyten, sowie eine daraufhin gesteigerte Lipolyse [58].

Zusätzlich werden durch hypoxische Zustände im Gewebe chemotaktisch weitere Makrophagen angelockt [59].

Zusammenfassend kann Diabetes mellitus also als eine inflammatorisch mitverursachte Erkrankung angesehen werden [9, 54].

### 1.1.6 Therapie

Wie die HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome)-Studie zeigen konnte, sollten auch Patientinnen mit geringen Einschränkungen im Insulinhaushalt adäquat behandelt werden, um die genannten Risiken zu minimieren [15]. Die primären Maßnahmen sollten grundsätzlich Veränderungen im Lebensstil umfassen. Die Ernährung der Schwangeren sollte ausreichend und ausgewogen sein, also die Versorgung mit sämtlichen Vitaminen und Nährstoffen sicherstellen. Der Anteil langkettiger Kohlenhydrate an der Gesamtkalorienzufuhr sollte bei 45% [60], die tägliche Kalorienzufuhr bei 1600-1800 kcal/Tag bzw. bei übergewichtigen Frauen bei ca 25 kcal/kgKG/Tag liegen. Auf eine zu drastische Regulierung der Energiezufuhr zum Zwecke der Gewichtsreduktion sollte in der Schwangerschaft verzichtet werden, um das Risiko einer lipolysebedingten Ketoazidose und einer Minderversorgung des Fötus zu vermeiden [61].

Die als unbedenklich geltende Gewichtszunahme während der Schwangerschaft ist abhängig vom BMI der Mutter präkonzeptionell und ist in folgender Tabelle dargestellt:

Präkonzeptioneller BMI (kg/m <sup>2</sup> / WHO)	Gewichtszunahme gesamt in der Schwangerschaft (kg)	Gewichtszunahme/Woche 2. u. 3. Trimenon* (kg)
18,5	12,5-18	0,5-0,6
18,5-24,9	11,5-16	0,4-0,5
25,0-29,9	7-11,5	0,2-0,3
≥ 30	5-9	0,2-0,3

*Tabelle 1: Empfohlener Bereich der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft [1, 11, 62]*

Die Zielwerte des Blutglucosespiegels sind nüchtern: 65-95 mg/dl (3,6-5,3 mmol/l), 1h postprandial: <140 mg/dl (<7,8 mmol/l) und 2h postprandial: <120 mg/dl (<6,7 mmol/l). Diese Zielwerte müssen allerdings immer im Gesamtkontext betrachtet und zwingend nach unten angepasst werden, sobald das Kind ein unproportionales Wachstum zeigt (insbes. bei isolierter Zunahme des Bauchumfangs), bzw. nach oben sobald das Kind Anzeichen einer Wachstumsrestriktion, oder die Mutter Tendenzen zu hypoglycämischen Zuständen zeigt [11]. Allein durch diätetische Maßnahmen können die erwünschten Glucosewerte selten erreicht werden. Körperliche Aktivität steigert die Insulinsensitivität durch erhöhte muskuläre Aufnahme und Glykogensynthese [63]. Allgemeine Empfehlungen gelten für 30 Minuten körperliche Aktivität an 5 Tagen/Woche [64]. Führen diese Maßnahmen nicht zum Erfolg, muss auf eine Insulintherapie mit kurz- oder langwirksamen Präparaten zurückgegriffen werden.

Orale Antidiabetika haben bisher in Deutschland keine Zulassung zur Anwendung in der Schwangerschaft [65].

Ein Großteil der Patientinnen erreicht postpartal wieder physiologische Blutglucosewerte, ohne weitere nötige Intervention. Zur Vermeidung der Langzeitfolgen wird empfohlen 6-12 Wochen postpartal einen erneuten 75g oGTT durchzuführen [66]. Ebenso entscheidend ist die Beibehaltung des oben genannten Lebensstils und eine baldige Gewichtsreduktion. Die Wiederholung des oGTT auch in den Folgejahren wird empfohlen.



## 1.2 Plazenta

### 1.2.1 Aufbau und Entstehung

Die Plazenta stellt in erster Linie eine feto-maternale Austauschzone dar und dient der Versorgung des Fetus mit Nährstoffen und Sauerstoff bzw. dem Abtransport von CO<sub>2</sub> und anderen Metaboliten, als eine Art Leber, Lunge, Darm und Niere für den Fetus [67]. Durch den komplexen Aufbau dient sie gleichzeitig auch als Schutzbarriere vor Xenobiotika und Krankheitserregern von maternaler Seite [68].

Die befruchtete Eizelle befindet sich am 4./5. Tag im Stadium der Blastozyste, in dem sich innerhalb des Zellverbundes ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum entwickelt, der die Zellmasse in einen äußeren Trophoblasten und einen innen liegenden Embryoblasten unterteilt [69]. Der Trophoblast lagert sich zur Implantation an das Endometrium an und differenziert sich weiter in zwei Zellschichten, den inneren Zytotrophoblast(CT), als teilungsaktive Zellschicht und den äußeren Synzytiotrophoblasten(SCT), in den die Zellen aus dem CT einwandern, verschmelzen und eine vielkernige Zellmasse ohne erkennbare Zellgrenzen bildet [70].

In der Vorbereitung auf die Schwangerschaft bildet sich in der Functionalis des Endometriums die Dezidua aus. Hierbei speichern die Dezidua-Zellen Glykogen und Lipide zur Versorgung des Embryos, bis ein funktionierender Blutkreislauf etabliert ist [68]. Außerdem wird vermutet, dass die Dezidua die Migration und Invasivität des Trophoblasten steuert und begrenzt [71].

Ab dem 9. Tag wird der SCT durch Lakunenbildung aufgelockert. Die Lakunen fließen zusammen und bilden den zusammenhängenden intervillösen Raum, in den mütterliches Blut aus arrodieren Kapillargefäßen fließt [69]. Ab dem 13. Tag proliferiert der CT kolumnenförmig in den SCT und bildet so die Primärzotten, die sich anschließend durch Mesenchymbildung im Kern zu Sekundärzotten weiterentwickeln, um am Ende der 3. Woche durch Kapillargefäßbildung im Mesenchym zu den endgültigen Tertiärzotten zu werden. Damit beginnt um den 21. Tag die Blutzirkulation [70]. An vereinzelten Stellen zieht der CT durch den intervillösen Raum bis zur Dezidua und bildet sogenannte Haftzotten [69]. Von der Dezidualplatte ziehen Septen Richtung Chorionplatte,

ohne die Plazenta vollständig zu unterteilen, diese Einheiten sind auf der maternalen Plazentaseite als Kotyledonen erkennbar [69]. Ihre endgültige Dicke von 2-4cm hat die Plazenta um den 5.Monat erreicht, ab da nimmt nur noch die Flächengröße bis zu einem Durchmesser von ca 20cm zu. Das endgültige Gewicht beträgt ca 500g [70]. Im intervillösen Raum befinden sich ca 150-200 ml mütterliches Blut, das aus ca 70 Spiralarterien stammt. Der Stoffaustausch findet über die Plazentaschranke statt, die bis zum 4. Monat aus Endothel und Basalmembran der fetalen Gefäße, dem Mesenchym in den Tertiärzotten, sowie dem CT und SCT besteht. Später wird die Schicht des CT zunehmend dünner, bis schließlich das fetale Gefäß unmittelbar dem SCT anliegt und der Stoffaustausch über eine Membran von nur noch 2-4 $\mu$ m Dicke erleichtert wird [70].

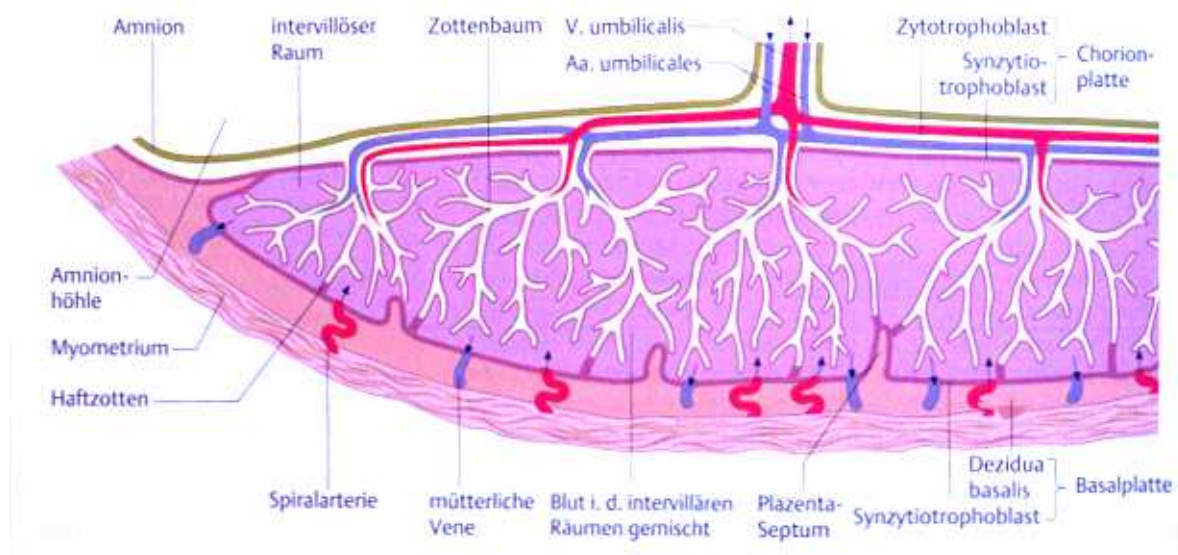


Abbildung 6: Aufbau einer reifen Plazenta [70]

### 1.2.2 Transport und metabolische Funktion

Der Transport von Nährstoffen, Gasen, Stoffwechselprodukten, Hormonen, Immunglobulinen aber auch Erregern oder Medikamenten findet entweder durch aktive (energieverbrauchender aktiver Transport, Pinozytose) oder passive (Diffusion, erleichterte Diffusion, Diapedese) Transportmechanismen statt [70]. Über den Mechanismus der Diffusion werden Sauerstoff und andere Gase, Bilirubin, Harnstoff, aber auch einige Medikamente transportiert, diese Substanzen folgen hierbei einem Konzentrationsgefälle zwischen maternalem

und fetalem Blut [67]. Wasser wird ebenfalls passiv über die Membran transportiert, hierbei aber unterstützt durch membranständige Kanäle [72]. Das Konzentrationsgefälle von Sauerstoff zwischen mütterlichem und kindlichen Kreislauf ist nur sehr gering, zur ausreichenden Versorgung des Fetus gibt es unterstützende Mechanismen, wie die höhere Sauerstoffaffinität des fetalen Hämoglobins(Hb), ein niedriger pH-Wert im mütterlichen Blut, der die O<sub>2</sub>-Affinität ihres Hb zusätzlich senkt, sowie die physiologische Tachykardie des Fetus [67]. Der Fetus verfügt kaum über Glykogenspeicher und ist nur sehr begrenzt zur Glukoneogenese befähigt, daher ist Glucose ein wichtiger Energielieferant, der im Sinne einer erleichterten Diffusion, unterstützt durch ein Transporterprotein (GLUT) , genauso wie das im Fetus entstandene Lactat über die Plazentaschranke transportiert wird [68]. Aminosäuren werden zur Synthese von Proteinen benötigt und sind im fetalen Blut zum Teil in höherer Konzentration als im mütterlichen vorhanden [73], genauso wie die Elektrolyte Kalium, Calcium und Phosphat [74], was einen energieverbrauchenden aktiven Transport über die Membran nötig macht. Es konnte die Beteiligung von Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen, Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher, sowie Na<sup>+</sup>abhängige Aminosäuretransporter nachgewiesen werden [75]. Ebenfalls aktiv transportiert werden Fettsäuren, Vitamine und Hormone [70]. Moleküle >10 kDa, wie Fette und Proteine, können die Membran nicht mehr per Diffusion überwinden. Der Transport dieser Substanzen, wie auch beispielsweise Immunglobuline  $\gamma$ , die dem passiven Immunschutz des Kindes dienen, findet durch Pinozytose statt. Hierbei stülpt sich ein Teil der Membran über die Substanz und transportiert diese als Vesikel durch die Zelle, um sie auf der anderen Seite wieder zu sezernieren [67].

Einen weiteren Transportmechanismus stellt die Diapedese dar, der größeren Substanzen wie Leukozyten, Erythrozyten, aber auch Viren und Bakterien den Übertritt ermöglicht. Hierbei kommt es durch Mikrotraumen in der Gefäßwand zu einer Durchwanderung durch diese Lücke [70]. Eine klinische Relevanz hat dieser Mechanismus neben der Übertragung von Infektionen beispielsweise bei Rhesusinkompatibilität, nach Übertritt von fetalem Rh<sup>+</sup>-Blut in den Kreislauf der Rh<sup>-</sup> Mutter, aber auch in der pränatalen Diagnostik durch die Analyse fetaler Zellen plazentaren Ursprungs im maternalen Blut [67].

### 1.2.3 Endokrine Funktion

Zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft hat der Organismus einen großen Hormonbedarf, deren Produktion die endokrinen Drüsen der Mutter allein nicht bewerkstelligen können. Die hypothalamische und hypophysäre Achse wird durch Rückkopplungsmechanismen aufgrund der hohen Konzentrationen an Steroidhormonen gehemmt. Die Plazenta unterliegt keiner Hemmung, so dass der SCT die Hormonproduktion oder deren Vorstufen übernimmt [67]. Es werden hauptsächlich humanes Choriongonadotropin (hCG), humanes Plazentalaktogen (hPL), humanes Chorionthyreotropin (hCT), ACTH-ähnliche Substanzen, humanes plazentäres Wachstumshormon (hPGH), Insulin-like growth factor (IGF), Gestagene wie Progesteron und Östrogene mit endokrinen, parakrinen oder autokrinen Funktionen gebildet [67, 68].

HCG hat aufgrund des strukturell ähnlichen Aufbaus auch eine ähnliche Funktion wie das luteinisierende Hormon (LH), die die Reifung der fetalen Gonaden, Follikel und den Deszensus der Hoden umfasst [70]. Außerdem erhält das hCG in den ersten Schwangerschaftswochen die Funktion des Corpus luteum, das die Gestagen- und Östrogenproduktion zur Aufrechterhaltung der Dezidua und damit der Schwangerschaft gewährleistet, bis nach 6-12 Wochen der SCT ausreichend Progesteron produzieren kann [70].

HPL hat strukturell große Ähnlichkeit mit dem Wachstumshormon und korreliert im Anstieg mit der Funktion des SCT bzw. dem allgemeinen Funktionszustand der Plazenta gegen Ende der Schwangerschaft [70]. HPL wirkt mit auf die Entwicklung der Brust, sowie auf die Vorbereitung zur Laktation ein [67]. Es stimuliert außerdem die Produktion von IGF und Surfactant [76]. Studien konnten einen Hinweis darauf geben, dass hPL eine periphere Insulinresistenz verursachen kann [77], durch den diabetogenen und lipolytischen Effekt ist für die Versorgung des Fetus mit Glukose, sowie Fett- und Aminosäuren gesorgt [67].

HPGH ähnelt strukturell stark dem hypophysären Wachstumsfaktor und scheint ebenfalls Einfluss auf die Plazentaentwicklung, sowie die Produktion von IGF zu haben [68]. Es konnte gezeigt werden, dass hPGH die PI3-Kinase im Skelettmuskel und dadurch den Signalweg zum Einbau von GLUTs in die Membran hemmt, was eine erniedrigte Insulinsensitivität zur Folge hat [78].

Die kontinuierlich steigende Produktion von Östrogenen findet in der Plazenta auf der Basis von maternalem Cholesterol und in der fetalen Nebenniere gebildetem Dehydroepiandrosteronsulfat statt. Östrogen wirkt sich hauptsächlich auf die physiologischen Anpassungsmechanismen des mütterlichen Systems, wie Gerinnungsfaktoren, Wasser-Salz-Haushalt und die Lipidsynthese aus [67].

Wie eingangs bereits erwähnt, dient das Progesteron der Aufrechterhaltung der Decidua graviditatis, sowie der Ruhigstellung der Uterusmuskulatur. Die Produktion leitet sich zu 80% von maternalem Cholesterol ab und wird vom Fetus als Vorstufe zur Gluko- und Mineralkortikoidsynthese genutzt [67].

Ein weiteres Proteohormon der Plazenta ist Leptin, eine das Hungergefühl unterdrückende und den Energiehaushalt beeinflussende Substanz, die ansonsten hauptsächlich in Adipozyten hergestellt wird. Physiologischerweise ist die Schwangerschaft ein Zustand der Leptinresistenz, sodass eine ausreichende Energieaufnahme gewährleistet wird [79]. Leptin hat einen Effekt der negativen Rückkopplung auf die Insulinsekretion [80] und steht daher im Verdacht ein positiver Prädiktor für GDM zu sein [81].

#### 1.2.4 Immunologische Funktion

Der Chromosomensatz des Menschen ist zu 50% maternalen und zu 50% paternalen Ursprungs, warum das Immunsystem der Mutter trotzdem nicht gegen den semi-allogenen Fetus aktiv wird, wird als immunologisches Paradoxon bezeichnet [82]. Die Grundlage dieses Paradoxons beruht auf der Tatsache, dass physiologischerweise kein direkter Kontakt zwischen fetalem und maternalem Gewebe besteht, sondern stets die Plazenta, als immunologisch regulierendes Organ zwischengeschaltet ist [83]. Eine schwangere Frau ist durchaus immunkompetent, wie es sich beispielsweise bei der Rhesusinkompatibilität im Falle des Übertritts von fetalem Rh<sup>+</sup> Blut in den Kreislauf der Rh<sup>-</sup> Mutter zeigt.

Die Heterogenität der HLA (human leukocyte antigen) zwischen Mutter und Kind scheinen der plazentaren Funktion und damit einer erfolgreichen Schwangerschaft sogar dienlich zu sein [83]. Die Fruchtbarkeit unter blutsverwandten Paaren, mit u.a. vermehrt übereinstimmenden HLA Regionen, ist

deutlich erniedrigt und die Fehlgeburtsrate deutlich erhöht [84]. Fast alle kernhaltigen Zellen des Menschen besitzen an ihrer Oberfläche spezielle MHC- (major histocompatibility complex) oder auch HLA-I-Moleküle, die die Zelle zur Präsentation intrazellulär synthetisierter Proteinfragmente befähigt, um dadurch im Falle der Präsentation von körperfremdem Material  $CD^{8+}$  T-Lymphozyten und andere Immunzellen zu aktivieren. Spezielle Immunzellen weisen MHC-II- bzw. HLA-II- Moleküle an der Oberfläche auf und können so den  $CD^{4+}$  T-Lymphozyten zuvor phagozytierte Fremdproteine präsentieren [85].

Die Zellen des CT und des SCT weisen weder HLA-II-Moleküle, noch die klassischen Subtypen HLA-A oder HLA-B der HLA-I-Moleküle auf, sodass eine Immunreaktion auf diese Zellen, trotz des direkten Kontaktes zwischen SCT und maternalem Blut, ausbleibt [86]. Die Plazenta verhält sich an diesem Punkt also immunologisch neutral [83].

Die Zellen des extravillösen Trophoblasten, die also invasiv in die Dezidua hineinwachsen, weisen allerdings ein für sie spezifisches Expressionsmuster von HLA-C, -G und -E Molekülen auf, und sind damit sichtbar für deziduale NK-Zellen und T-Lymphozyten [86]. Dennoch bleibt eine Bekämpfung des SCT durch das mütterliche Immunsystem aus. Eine mögliche Erklärung ist, dass dNK-Zellen durchaus mit den HLA-Molekülen interagieren, über verschiedene exprimierte Rezeptoren kann es hierbei allerdings zur Aktivierung oder Hemmung der Zytotoxizität der dNK-Zellen kommen [83]. Demnach scheint die Aktivität der dNK-Zellen durch Regulierung der Angiogenese, sowie der dezidualen Invasion des Trophoblasten essentiell für den Erfolg der Schwangerschaft zu sein [87].

Eine weitere stark vertretene Zellreihe sind Hofbauerzellen, also Dezidua-spezifische Makrophagen, die vermutlich ihren Beitrag zur Bekämpfung von bakteriellen und viralen Infektionen leisten [87], sowie immunregulatorische Interleukine, wie IL-10 sezernieren [82].

Dendritische Zellen sind hingegen nur minimal und dann auch nur in unmittelbarer Umgebung zu maternalen Gefäßen nachweisbar, vermutlich bedingt durch die kaum vorhandenen lymphatischen Gefäße innerhalb der Plazenta und gelten als Überbleibsel aus dem Endometrium vor der Implantation [87], scheinen aber ebenfalls immunregulatorische Zytokine zu sezernieren [82].

Auch eine gewisse Anzahl von T-Zellen wurde nachgewiesen, deren genaue Funktion scheint aber noch nicht abschließend geklärt zu sein [87].

Das Immunsystem der Plazenta steht nicht nur in Interaktion mit dem Fetus, sondern hat ebenfalls Einfluss auf das maternale System. Immunzellen und der SCT sezernieren beispielsweise Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und -10 oder Leptin und haben damit über oben bereits beschriebene inflammatorische Mechanismen Einfluss auf den Metabolismus der Mutter [88]. Auch Mikropartikel des SCT, die in den mütterlichen Kreislauf gelangen können, stimulieren systemische Immunzellen und führen zu erhöhten Konzentrationen der Zytokine [82].

## 1.3 Interleukine

Interleukine sind Proteine und gehören wie u.a. Interferone, Tumor-Nekrose-Faktoren, transformierende Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierende Faktoren und Chemokine zur Gruppe der Zytokine [89]. Sie dienen als Mediatoren und damit der Kommunikation zwischen Immunzellen, wie Makrophagen, B- und T-Zellen und deren Migration [90]. Es sind bereits viele verschiedene Vertreter der Interleukine bekannt, die genauen Funktionen sind bisher aber noch nicht abschließend geklärt. Man weiß beispielsweise, dass IL-1 $\beta$  und IL-6 wichtige Entzündungsmediatoren sind, die u.a. systemische Effekte wie Fieber oder Schockzustände auslösen können, IL-2 ist einer der wichtigsten T-Zell-Stimulatoren, während IL-4 vor allem die Differenzierung von T-Helferzellen bewirkt und Einfluss auf die Immunglobuline der Klasse E hat. Zusammen mit IL-5, das eosinophile Granulozyten stimuliert, hat IL-4 also großen Einfluss auf Allergien. IL-10 ist der wichtigste immunsuppressive Mediator, durch Hemmung anderer proinflammatorischer Interleukine [90].

### 1.3.1 Interleukin 7

Interleukin 7 wird hauptsächlich in den Stromazellen des Thymus und des Knochenmarks, sowie in Lymphorganen und Epithelzellen von Leber und Intestinaltrakt, Keratinozyten und anderen Zellen produziert [91]. Auch Dendritische Zellen und Makrophagen sezernieren kleine Mengen IL-7 [92]. IL-7 wirkt über IL-7 Rezeptoren aktivierend auf den intrazellulär gelegenen JAK-

STAT-Signalweg und hat dadurch eine antiapoptotische und stimulierende Wirkung auf unreife B-Zellen und naive T-Zellen [93]. In einem Mechanismus der Selbstregulation werden bei bereits aktivierten T-Zellen die IL-7-R runterreguliert, sodass IL-7 hier keine Wirkung mehr zeigen kann [93]. Studien haben außerdem gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration von IL-7 im Fettgewebe von adipösen Menschen festgestellt werden kann. Dadurch stellt IL-7 einen potentiellen Mediator der Adipositas-bedingten Inflammation dar [94].

### 1.3.2 Interleukin 8

Interleukin 8, oder auch CXCL8, ist ebenfalls ein proinflammatorisches Interleukin, das hauptsächlich von aktivierten Monozyten, Makrophagen, vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten aus einem Entzündungsgebiet sezerniert wird [95]. Diese Zellen werden durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Lipopolysaccharide, virale Produkte oder oxidativen Stress, über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, stimuliert [96, 97]. Interleukin 8 wirkt über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2, die unter anderem auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten stark vertreten sind [95]. Intrazellulär bewirkt die Aktivierung eine Veränderung im Zytoskelett, was die Gewebsmigration der Leukozyten ermöglicht [95]. Auch ein Einfluss auf die feste Adhäsion zirkulierender Monozyten an der Endothelwand durch IL-8 konnte gezeigt werden [98]. Über die Rezeptoren CXCR1 und 2, die ebenfalls auf vaskulären Endothelzellen vertreten sind, fördert IL-8 durch Expression von Matrix-Metalloproteinasen die Migration durch die Endothelzellen [99].

### 1.3.3 Interleukin 15

Interleukin 15 ist ein weiteres proinflammatorisch wirkendes Zytokin, mit komplexen Wirkmechanismen, sowohl auf das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem. IL-15 wird von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Keratinozyten, Fibroblasten, Epidermiszellen, Knochenmarkszellen, aber auch die Niere, die



Plazenta, die Lunge, das Herz und das Gehirn [100]. Die Wirkung wird hauptsächlich über den IL-15 Rezeptor  $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ) vermittelt, der auf vielen Zellen vertreten ist, u.a. auf T- und B-Lymphozyten, sowie Makrophagen [101]. Die Bindung an den IL-15R $\alpha$  führt zu einer intrazellulären Aktivierung der JAK, die wiederum STAT Proteine phosphoryliert und damit zellspezifische Effekte auslöst [102]. Durch diesen Mechanismus hat IL-15 u.a. eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und letztlich dem Überleben der natürlichen Killerzellen, die ihrerseits über die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die inflammatorische Reaktion weiterhin aufrechterhalten [102]. Durch IFN- $\gamma$  werden beispielsweise Monozyten zur weiteren Produktion von IL-15 stimuliert, welches seinerseits Monozyten und neutrophile Granulozyten zu einer erhöhten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 stimulieren kann und somit u.a. wie o.g. weitere Neutrophile zum Ort der Inflammation locken kann [103-105]. Andererseits fördern niedrige Konzentrationen von IL-15 die Produktion von IL-10, einem antiinflammatorisch wirkenden Zytokin [105]. DC produzieren IL-15 und gleichzeitig werden sie durch IL-15 zur eigenen Differenzierung stimuliert und die Apoptose wird verhindert [106]. Indirekt werden durch die von IL-15 aktivierten DC reifende B-Lymphozyten zur Proliferation stimuliert [107]. Des Weiteren spielt IL-15 eine große Rolle im Überleben von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, indem es die Expression des antiapoptotischen Moleküls Bcl-2 steigert [108].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie, durchgeführt in der Klinik für Frauenheilkunde der Ludwig Maximilians Universität (LMU) München mit insgesamt 80 eingeschlossenen graviden Frauen. Bei allen Teilnehmerinnen war gemäß der Richtlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) [1] zwischen der 24. und 28. SSW ein 75-g oGTT durchgeführt worden. Gemäß den Kriterien der DDG (Glucosewert nüchtern  $\leq 92$  mg/dl; nach 1 h  $\leq 180$  mg/dl; nach 2h  $\leq 153$  mg/dl) ergab sich bei 40 der teilnehmenden Probandinnen die Diagnose eines GDM. Die Gruppe „GDM“ wurde weiter nach dem Geschlecht des Kindes in „GDM weiblich“ und „GDM männlich“ unterteilt. Die 40 Teilnehmerinnen ohne GDM dienen als Kontrollgruppe, ebenfalls nach Geschlecht des Kindes unterteilt in „Kontrolle weiblich“ und „Kontrolle männlich“.

Nach der Entbindung wurde aus jeder Plazenta eine ca. 2x2x2cm große zentral gelegene Gewebeprobe eines gut durchbluteten Koryledonon entnommen. Hierbei wurden offensichtlich kalzifizierte, nekrotische oder minderdurchblutete Bereiche konsequent ausgelassen. Die Gewebeproben stellen einen Durchschnitt durch die Plazenta dar und enthalten Zellen des CT, SCT, der Dezidua, sowie amniotische Zellen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in 4% Formalin eingelegt und nach 24 Stunden in Paraffin fixiert, um anschließend für die Schnittherstellung zur immunhistochemischen Färbung weiterverarbeitet zu werden.

Alle Probandinnen wurden im Vorfeld ausführlich aufgeklärt und gaben ausdrücklich ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der LMU genehmigt. Ausschlusskriterien waren Mehrlingsschwangerschaften, Frühgeburtlichkeit (<37. SSW), Infektionen, Fehlbildungen und Wachstumsretardierung. (Vgl. Studiendesign in [109]) In der folgenden Tabelle sind die Studienteilnehmerinnen dargestellt.

	GDM	Kontrolle
Alter der Mutter (Jahre)	32,83 ± 4,56	31,08 ± 6,16
Gewicht der Mutter (kg)	77,49 ± 19,08	65,29 ± 17,83
BMI	28,13 ± 6,96	23,35 ± 6,21
Gestationsalter (Wochen)	39,85 ± 1,29	39,78 ± 1,35
Geburtsgewicht (g)	3611,38 ± 0,08	3316,88 ± 501,73
pH Umbilikalblut	7,30 ± 0,08	7,29 ± 0,09
Vaginale Geburt (%)	67	80
Wehen vorhanden (%)	85	85

*Tabelle 2: Klinische Kriterien der Studienteilnehmerinnen*

## 2.2 Immunhistochemie

### 2.2.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Nach der Fixierung in Formalin, zur Hemmung der Autolyse und Vernetzung des Gewebes, wurden die Plazentaprobe in Paraffin gebettet und zu festen Blöcken ausgehärtet. Mittels eines Schlittenmikrotoms wurde der Paraffinblock in 2-3µm dicke Schnitte zerteilt. Diese Gewebeschnitte wurden anschließend im 45°C warmen Streckbad zur Entfaltung eingelegt und auf Objektträgern im Brutschrank bei ca. 56°C getrocknet. Die Objektträger wurden im Vorfeld bereits silanisiert, um eine bessere Haftung der Präparate auf den Objektträgern zu gewährleisten.

### 2.2.2 Antikörper

Die Grundlage der immunhistologischen Nachweisttechnik ist die Antigen-Antikörperreaktion. Der Antikörper(Ak) ist ein Protein, das von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen als Reaktion auf ein spezifisches Antigen(Ag) sezerniert wird. Er besteht aus zwei schweren heavy(h)-chains und zwei leichten light(l)-chains, die im Falle eines Immunglobulin G, Y-förmig angeordnet sind. Die Basis der Y-Figur stellt das konstante Fc-Segment, die Arme das variable Fab-

Segment dar, welches spezifisch an die Epitop-Region des entsprechenden Antigens bindet. Es können, wie in dieser Studie, monoklonale, also völlig identische, oder polyklonale, von verschiedenen Wirten gewonnene, Ak verwendet werden. Gewonnen werden diese Ak durch die Immunisierung des Tieres mit dem entsprechenden Ag und der anschließenden Entnahme von Blut oder lymphatischen Organen.[110]

### 2.2.3 Nachweismethode

Antigene lassen sich direkt, durch den passenden und markierten Ak, oder indirekt, durch mehrfache Ak-Bindung, nachweisen. Bei der indirekten Methode bindet ebenfalls ein spezifischer, aber unmarkierter Primär-Ak an das Antigen. Anschließend wird dem Komplex ein weiterer Sekundär-Ak beigelegt, dieser ist spezifisch gegen die Spezies, von der der Primär-Ak stammt, gerichtet und bindet somit an diesen. Der Sekundär-Ak ist außerdem mit einem Enzym oder Farbstoff markiert, der den Gesamtkomplex und damit indirekt das Ag nachweisbar macht.[110]

Eine spezielle Form des indirekten Ag-Nachweises, der hier genutzt wurde, ist die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC). Avidin ist ein Protein aus Hühnereiweiß, mit einer hohen Affinität zu Biotin. Aus Gründen der Reinheit wird heutzutage hauptsächlich das aus Bakterien gewonnene Streptavidin genutzt. Wie oben bereits beschrieben, bindet der Primär-Ak an das Ag, der Sekundär-Ak ist in diesem Fall aber biotinyliert. An das Biotin bindet sich nun der ABC, der aus Streptavidin und dem biotinylierten Enzym Peroxidase besteht, das mit 3,3Diaminobenzidin (DAB) ein bräunliches Farbprodukt bildet.

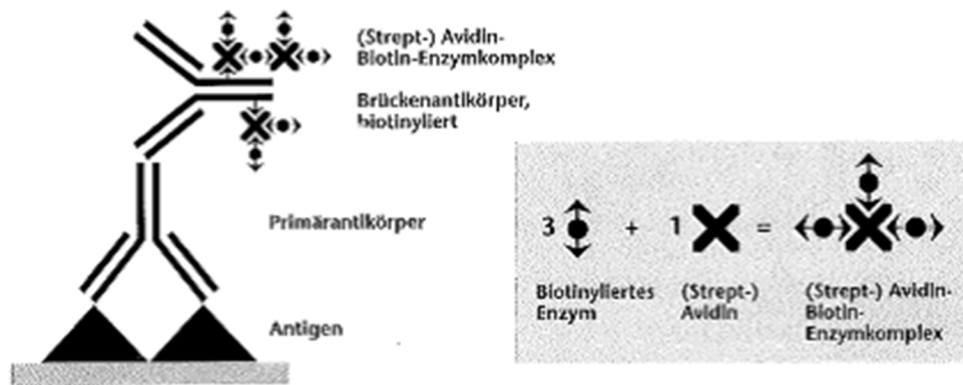


Abbildung 7: ABC Methode, mit Primär-Ak, biotinyliertem Brücken-Ak und ABC-Komplex [110]

## 2.2.4 Immunhistochemische Färbung

Um die zuvor in Formalin und Paraffin fixierten Gewebeschnitte weiter bearbeiten zu können, mussten sie zunächst für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert, und anschließend in 100% Ethanol geschwenkt werden. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren und damit spätere Interferenzen in der Farbreaktion zu vermeiden, wurden die Schnitte für weitere 20 Minuten in dem Peroxidase-Substrat Wasserstoffperoxid gemischt mit Methanol eingelegt. In der darauffolgenden absteigenden Alkoholreihe (100%, 70%, 50%) und der abschließenden Spülung mit Aqua destillata (Aqua dest) wurden die Gewebeproben rehydriert und durch zweimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (pH 7,2) von Rückständen befreit. Die Gewebeschnitte, die anschließend mit den Ak gegen IL-7 und IL-8 inkubiert werden sollten, mussten zunächst für 5 Minuten in einem Schnellkochtopf in Natrium-Citratpuffer pH 6,0 gekocht werden, um durch die Hitzebehandlung die entsprechenden Ag zu demaskieren. Für die mit IL-15 inkubierten Gewebeschnitte blieb dieser Schritt aus.

Der nächste, für alle drei Färbungen gemeinsame, Schritt war die dreiminütige Behandlung mit einem Power Block, der im Gewebe elektrostatische Ladungen absättigt, um die unspezifische hydrophobe Bindung der später hinzugefügten Immunglobuline an Membranen oder Fettgewebe und damit eine verfälschte Färbereaktion zu verhindern. Nach Abschütteln des Blockiermittels, ohne einen weiteren Waschvorgang, wurden die Schnitte für mindestens 16

Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem jeweiligen Primär-Ak (jeweils gegen IL-7, 8 oder 15) inkubiert. Auf erneutes zweimaliges Spülen mit PBS folgte die 30-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Ak und danach mit dem ABC-Komplex, für ebenfalls 30 Minuten. Nach wiederholtem Spülen mit PBS wurde dem Antikörperkomplex für eine Minute das DAB zugefügt, um mithilfe der Ak-gebundenen Peroxidase die Farbreaktion zu ermöglichen. Durch das Spülen mit Aqua dest. wurde die Farbreaktion gestoppt.

Die Gegenfärbung des restlichen Gewebes erfolgte für zwei Minuten durch saures Hämalun nach Mayer und anschließendem Bläuen für fünf Minuten in Leitungswasser. In der aufsteigenden Alkoholreihe bis zurück zu Xylol wurden die Gewebeschnitte erneut dehydriert, um anschließend mit dem hydrophoben Fixiermittel Shandon Consul Mount auf dem Objektträger unter einem Deckglas endgültig fixiert zu werden [111]. Nach diesem Vorgehen wurden jeweils 20 Gewebsschnitte aus den Gruppen „GDM w“, „GDM m“, „Kontrolle w“, „Kontrolle m“ und zu jedem Durchlauf jeweils eine Positivkontrolle bearbeitet. Als Positivkontrollen wurden folgende Gewebsschnitte verwendet:

<i>Antikörper</i>	<i>Positivkontrolle</i>
Anti IL-7	Colon
Anti IL-8	Colon
Anti IL-15	Plazenta

*Tabelle 3: Positivkontrollen der jeweiligen Antikörper*

### 2.2.5 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Farbintensität, die dem Vorkommen der Antikörperkomplexe und damit der Expression des jeweiligen Ag entsprechen, wurde mithilfe eines Lichtmikroskops gemäß dem Immunoreaktiven Score (IRS) nach Remmele durchgeführt [112]. Bei dieser Methode wird lichtmikroskopisch die Intensität der gefärbten Zellen bestimmt, sowie der prozentuale Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtheit der jeweiligen Zellpopulation. Die Intensitätsstufen reichen von 0 bis 3 und entsprechen den Einteilungen negativ, schwach, mittel und stark. Bei der prozentualen Verteilung werden die einzelnen Bereiche

ebenfalls Werten von 0 bis 4 zugeteilt, ein Anteil von 0% gefärbter Zellen entspricht demnach einem Wert von 0, 1-10% entsprechen 1, 11-50% entsprechen 2, 51-80% entsprechen 3 und >80% ist dem Wert 4 zugeteilt. Die ermittelten Zahlenwerte der Intensität und der Verteilung werden miteinander multipliziert und ergeben anschließend den Score-Wert. Die Werte können also von 0 bis maximal 12 reichen. Diese Auswertung wurde für alle drei getesteten IL in den GDM- und Kontrollgruppen für jeweils beide Geschlechter durchgeführt. Hierbei wurden jeweils die Scores für die Zellen des SCT, sowie des extravillösen CT, also die Zellen der Dezidua bestimmt.

## 2.3 Immunfluoreszenz

Ziel der Doppelfärbung mittels Immunfluoreszenz ist es, verschiedene Antigene in einem Schnitt simultan nachweisbar zu machen. Der Mechanismus ist ähnlich dem der Immunhistochemie mittels Antikörperbindung und indirektem Ag-Nachweis.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden ebenfalls die in Formalin und Paraffin fixierten Gewebeschnitte der Plazenten aus der GDM-, sowie der Kontrollgruppe verwendet. Für jedes der drei zu untersuchenden Interleukine wurde beispielhaft ein Schnitt entweder aus der GDM- oder der Kontrollgruppe verwendet, um exemplarisch die richtige Zuordnung der Gewebeanteile zum extravillösen Trophoblast, also den Zellen der Dezidua bzw. zum Synzytiotrophoblasten zu belegen. Hierzu wurde ein HLAG-FITC markierter Antikörper verwendet, der den EVT, als HLA exprimierendes Gewebe, eindeutig markiert.

Die Schnitte wurden zunächst für 20min in Xylol entparaffiniert und in 100% Ethanol entwässert. Durch 20 minütiges Einlegen in einem 0,3% Wasserstoffperoxid-Methanol-Gemisch wurde die endogene Peroxidase blockiert, deren Aktivität ansonsten Einfluss auf die endgültige Farbreaktion haben würde. Nach dem Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe von 100%, über 70% bis 50% und dem abschließenden Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte zur Ag-Demaskierung einer Hitzevorbehandlung unterzogen. Hierzu wurden sie in einem Schnellkochtopf für 5 min in einem Na-Citratpuffer mit pH 6,0 erhitzt.

Durch die anschließende 15 minütige Inkubation mit dem Ultra Vision Protein Block wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert, um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden.

Über Nacht erfolgte nun die Inkubation mit dem jeweiligen von Mäusen stammenden Primär-Ak für IL-7 (Verdünnung 1:100), bzw IL-8 (Verdünnung 1:250) oder IL-15 (Verdünnung 1:1000) bei 4°C.

Um die Fluoreszenzfarbstoffe zu erhalten fanden die folgenden Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum statt. Den Schnitten wurden die als Sekundär-Ak dienenden Cy3 markierten Goat-Anti-Mouse IgG in einer Verdünnung von 1:500 zugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen in PBS folgte die einstündige Inkubation mit dem HLAG-FITC markierten zweiten Primär-Ak, einem Mouse IgG, das der Darstellung des EVT dienen soll.

Die Schnitte wurden bis zum vollständigen Trocknen im Dunkeln aufbewahrt und anschließend mit einem speziellen mounting Medium für Fluoreszenzfärbungen und 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI), als Medium zur Kernfärbung, eingedeckt.

Im unmittelbaren Anschluss wurden die Bilder der Schnitte mit dem Kamera-Mikroskop AxioCam, unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Axiovision erstellt.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics von IBM in der Version 23. Zur Varianzanalyse wurden die vorliegenden parameterfreien Variablen mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney zur Feststellung eines signifikanten Unterschiedes in den jeweiligen Gruppen untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $<0,05$  festgesetzt.



## 2.5 Material

### 2.5.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Axiocam	Zeiss (Oberkochen, GER)
Deckgläser	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss (Oberkochen, GER)
Kamera KY-F55BE	JVC (Yokohama, Japan)
Kochfeld THL 2597	Rommelsbacher (Dinkelsbühl, GER)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle, CH)
Lichtmikroskop Diaplan	Leitz (Wetzlar, GER)
Mikrotom Hn 40	Reichert-Jung (Buffalo, USA)
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, GER)
Pippettenspitzen	Biozym (Hessisch Oldendorf, GER) Eppendorf AG (Hamburg, GER)
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG (Hamburg, GER)
Schnellkochtopf Vitavit	Fissler GmbH (Idar-Oberstein, GER)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein (Zürich, CH)

*Tabelle 4: Verwendete Geräte*

## 2.5.2 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Aqua destillata	LMU, Apotheke Innenstadt (München, GER)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun (Melsungen, GER)
Citronensäure 0,1 M	Merck; Nr 244 (Darmstadt, GER)
Dako antibody diluent	Dako (Glostrup, DK und Carpinteria, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, GER)
Ethanol (50%, 70%, 96%, 100%)	LMU, Apotheke Innenstadt (München, GER)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, GER)
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako; Best.Nr: K3468 (Glostrup, DK und Carpinteria, USA)
Mayers Hämalaun	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, GER)
Natrium-Citrat 0,1 M	Merck; Nr 6448 (Darmstadt, GER)
PBS Dulbecco w/o $\text{Ca}^{2+}$ , w/o $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG (Berlin, GER)
PowerBlock: Universal Blocking Reagent	BioGenex; Nr: HK0851008 (Fremont, USA)
Shandon Consul Mount	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ultra Vision Protein Block	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI	Vector laboratories Inc. (Burlington, CA, USA)
Wasserstoffperoxid 30% AnalaR Normapur	VWR International (West Chester, USA)
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, GER)

*Tabelle 5: Verwendete Chemikalien*

### 2.5.3 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
Goat-Anti-Mouse IgG Cy 3	Dianova; Best.Nr.:115-167-003 Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA)
HLA-G-FITC Mouse IgG monoklonal, Klon: MEM G/9	Serotec; Best.Nr: MCA2044F Bio-Rad AbD Serotec GmbH (Puchheim, GER)
IL-15 Monoklonal, mouse IgG	Abcam; Best.Nr: ab55276 (Cambridge, UK)
IL-7 (500µg/ml) monoklonal, mouse IgG;Klon: 7417	R&D Systems;Best.Nr:MAB207 (Minnea- polis, USA)
IL-8 (1mg/ml) monoklonal, mouse IgG; Klon:807	Abcam; Best.Nr: ab18672 (Cambridge, UK)
Vectastain Elite ABC mouse-IgG-Kit Sekundär-Ak	Vector Laboratories (Burlingame, USA) Linaris; Best.Nr: PK-6102

*Tabelle 6: Verwendete Antikörper*

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Interleukin 7

Die immunhistochemische Färbung erbrachte den lichtmikroskopischen Nachweis von IL-7 sowohl im SCT, als auch im extravillösen Trophoblast (EVT), das heißt, den Zellen der Decidua. Der Nachweis gelang bei Schnitten aus der GDM-Gruppe, sowie der Kontrollgruppe. Es zeigten sich aber durchaus Unterschiede in der Intensität und der Verteilung.

#### 3.1.1 IL-7 GDM vs. Kontrolle

Im Gesamtvergleich zeigte sich eine erhöhte IL-7 Expression im SCT der Plazentaschnitte aus der GDM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, der allerdings statistisch als gerade nicht mehr signifikant angesehen werden muss (Median IRS 9 vs. 8;  $p=0,056$ ). Im Vergleich der GDM-Gruppe mit der Kontrollgruppe, isoliert für die männlichen Plazenten betrachtet, zeigte sich im SCT ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der IL-7 Expression (Median IRS 10,5 vs 6;  $p=0,398$ ).

Ebenso konnte in der weiblichen Gruppe kein signifikanter Unterschied in der IL-7 Expression im SCT im Vergleich der GDM- mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (Median IRS 8 vs. 8;  $p=0,091$ ).

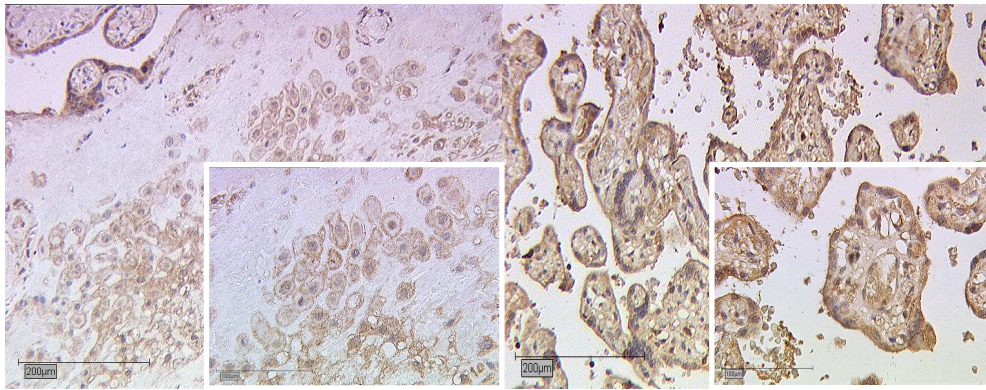
Entgegen der Ergebnisse im SCT, ergab die Untersuchung des EVT im Gesamtvergleich GDM- mit der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied in der IL-7 Expression (Median IRS 8 vs. 6;  $p=0,047$ ). Im EVT zeigte sich allerdings ein größerer Unterschied bei den Geschlechtern. So ergab der Vergleich der GDM- und der Kontrollgruppe unter den männlichen Feten keinen signifikanten Unterschied (Median IRS 8 vs. 5;  $p=0,461$ ), während der EVT weiblicher Feten eine signifikant höhere Expression von IL-7 zeigte (Median IRS 8 vs. 6;  $p=0,03$ ).

Anhand des Spearman Korrelationskoeffizienten, konnte insgesamt eine starke positive Korrelation der Expression von IL-7 im SCT und im EVT gefunden werden ( $r=0,797$ ;  $p=0,000$ ).

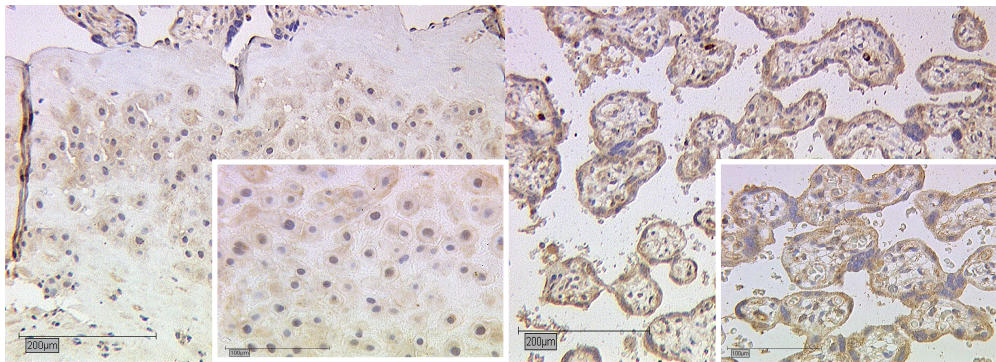
### 3.1.2 IL-7 weiblich vs. männlich

In der Betrachtung des IL-7 zeigte der Vergleich der beiden GDM Gruppen miteinander keinen signifikanten Unterschied zwischen den SCT der weiblichen und männlichen Plazenten (Median IRS 8 vs. 10,5;  $p=0,355$ ). Auch der Vergleich der Kontrollgruppen der weiblichen und männlichen Gruppen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Median IRS 8 vs. 6;  $p=0,265$ ).

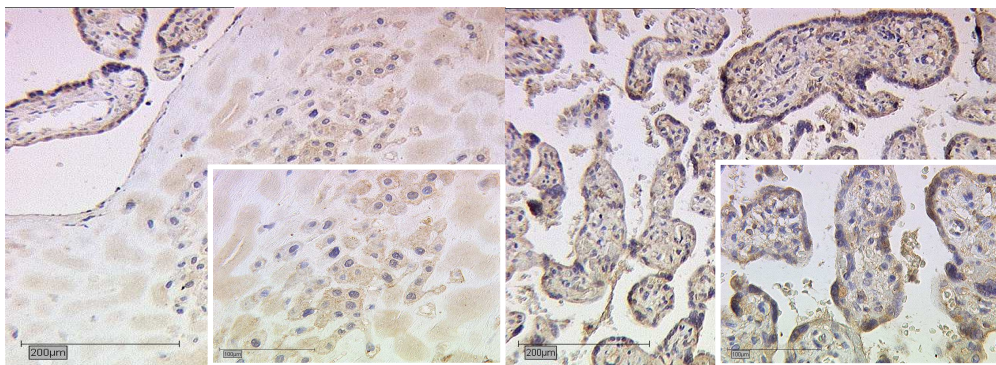
Auch im EVT erbrachte der Vergleich der GDM-Gruppen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (Median IRS 8 vs. 8;  $p=0,708$ ). Ebenso zeigten die Kontrollgruppen aus der männlichen, sowie weiblichen Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der Expression von IL-7 im EVT (Median IRS 5 vs. 6;  $p=0,204$ ).



*Abbildung 8 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 9 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 10 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



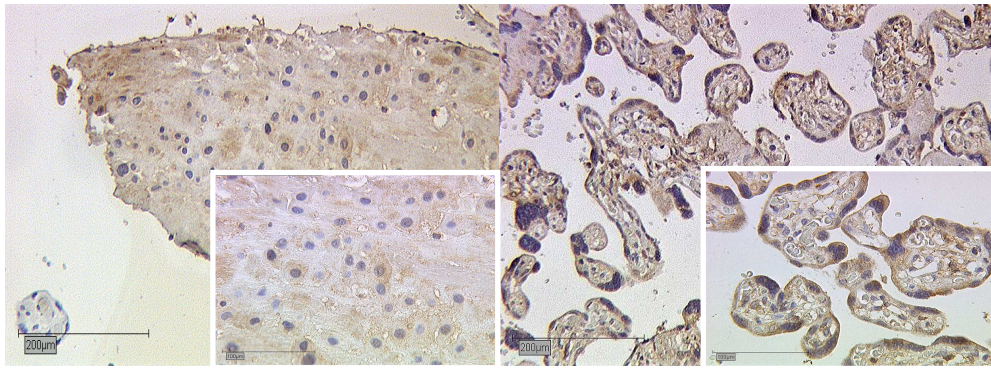


Abbildung 11 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

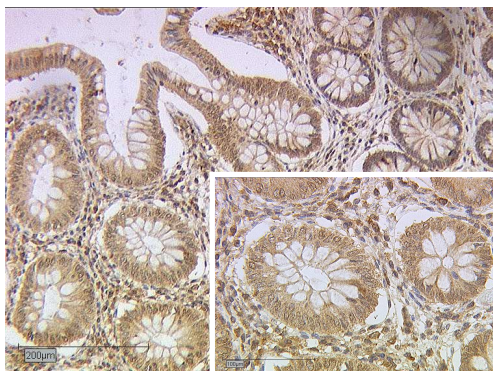


Abbildung 12 IL-7 Expression im Kolon als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

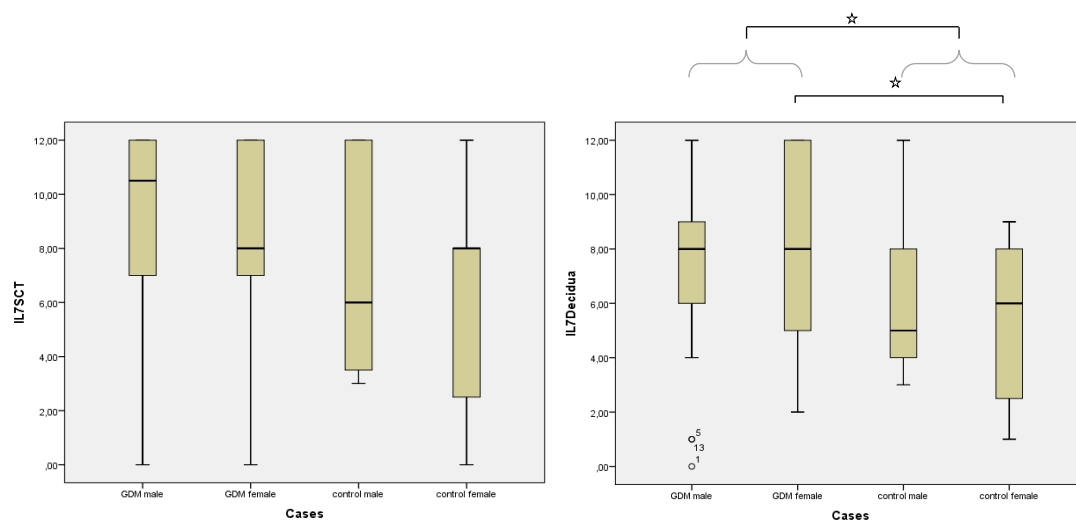


Abbildung 13 Box-Plot IL-7,  $\star p < 0,05$

## 3.2 Interleukin 8

Auch die Expression von IL-8 in allen untersuchten Gewebsschnitten, im SCT und im EVT, bei GDM und der Normalkontrolle, sowie bei Jungen und Mädchen konnte lichtmikroskopisch in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden, wenn auch insgesamt nur verhältnismäßig schwach.

### 3.2.1 IL-8 GDM vs. Kontrolle

Der Median IRS im SCT der GDM-Gruppe, sowie der Kontrollgruppe liegt bei 1, im EVT bei 1 bzw. 2 respektive und zeigt damit die insgesamt eher schwache Expression von IL-8.

Der Unterschied zwischen der GDM- und der Kontrollgruppe im SCT kann nicht als signifikant betrachtet werden ( $p=0,516$ ). Im SCT zeigt sich allerdings ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Vorhandensein von IL-8. Laut den Ergebnissen enthält der SCT bei Mädchen, im Falle eines GDM größere Mengen an IL-8, als die Kontrollgruppe (Median IRS 2 vs. 0;  $p=0,008$ ).

Bei den männlichen Feten zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den GDM positiven Plazenten und der Kontrollgruppe, allerdings ist die Expression hierbei im SCT der Kontrollgruppe höher (Median IRS 0 vs. 1,5;  $p=0,052$ ).

Im Gegensatz zum SCT sezerniert der EVT im Gesamtvergleich der Gruppen bei GDM positiven Plazenten signifikant weniger IL-8 als in den Plazenten aus der Kontrollgruppe (Median IRS 1 vs. 2;  $p=0,003$ ). Ebenso verhält es sich bei den geschlechtsspezifischen Vergleichen der GDM- mit der Kontrollgruppe. Sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Feten scheint der EVT in der gesunden Kontrollgruppe mehr IL-8 zu sezernieren, als in den GDM positiven Plazenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte allerdings nur im Falle der männlichen Feten festgestellt werden (♂: Median IRS 1 vs. 3;  $p=0,000$ ; ♀: Median IRS 1 vs. 2;  $p=0,531$ ).

Auch im Expressionsverhalten von IL-8 konnte eine positive Korrelation zwischen den Zellen des SCT und des EVT gezeigt werden ( $r=0,417$ ;  $p=0,000$ ).

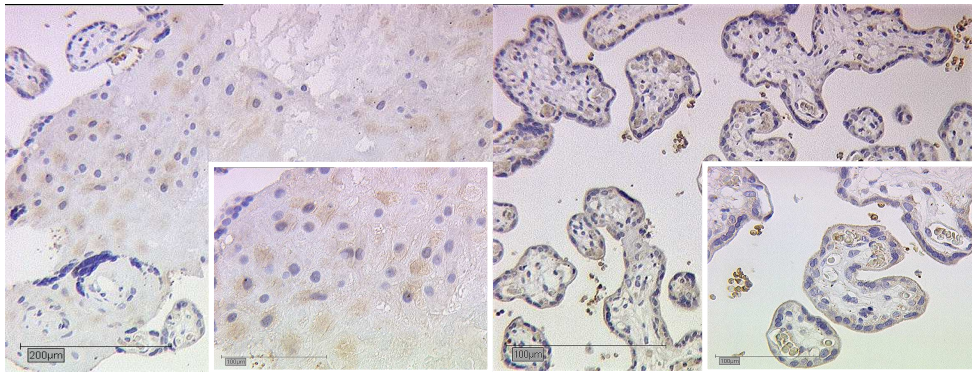


Nach der Einteilung von Cohen[113] entspricht dies einer mittleren Effektstärke.

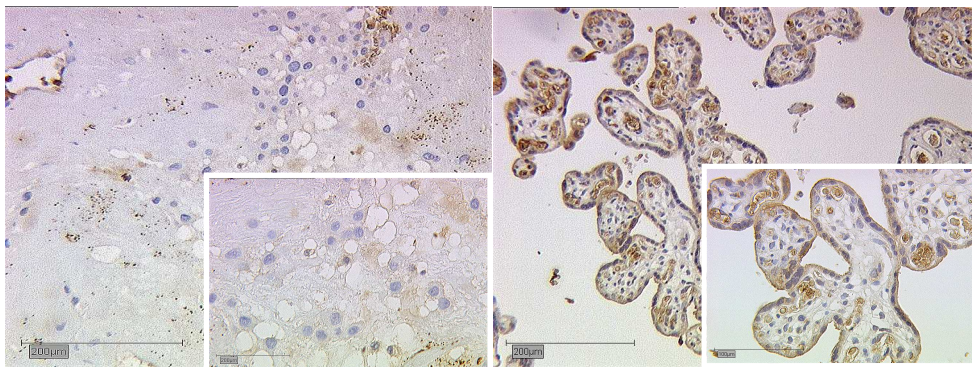
### 3.2.2 IL-8 weiblich vs. männlich

Auch im geschlechtsspezifischen Vergleich der GDM-Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vorkommen von IL-8, wobei die Expression im SCT bei Mädchen stärker ausgeprägt zu sein scheint (Median IRS 0 vs. 2;  $p=0,004$ ). Im Vergleich der Kontrollgruppen hingegen zeigte der SCT auch bei IL-8 kein unterschiedliches Expressionsmuster (Median IRS 1,5 vs. 0;  $p=0,091$ ).

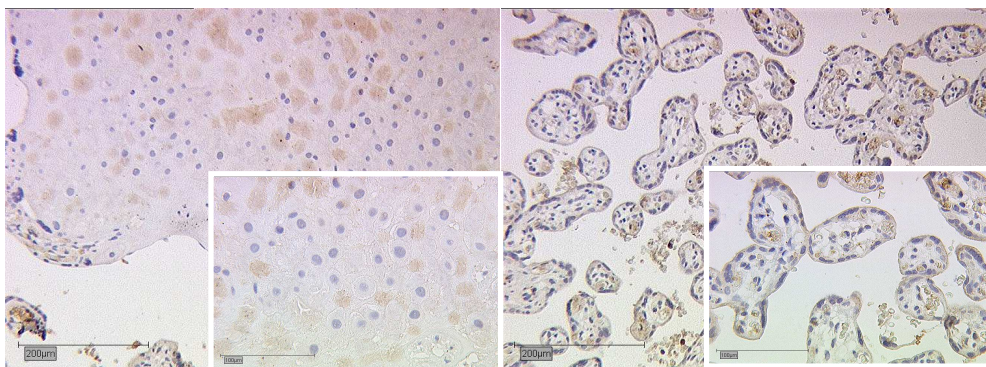
Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der IL-8 Expression im EVT konnte weder im Vergleich der jeweiligen GDM-Gruppen, noch der Kontrollgruppen gezeigt werden (GDM: Median IRS 1 vs. 1;  $p=0,402$ ; Kontrolle: Median IRS 3 vs. 2;  $p=0,093$ ).



*Abbildung 14 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 15 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 16 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*

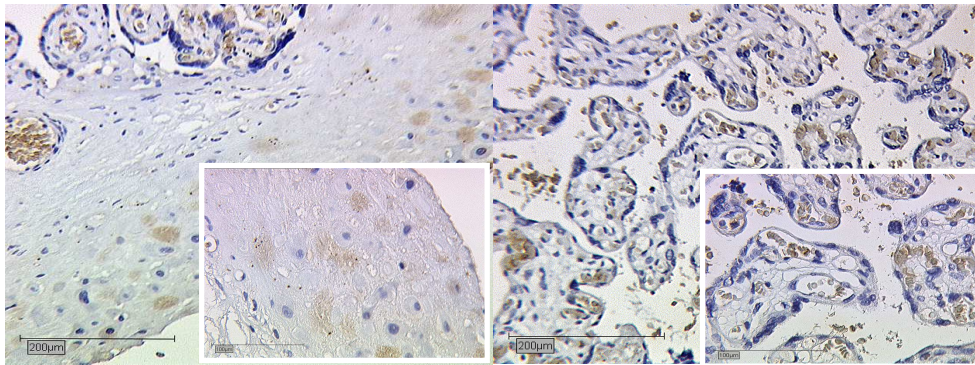


Abbildung 17 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

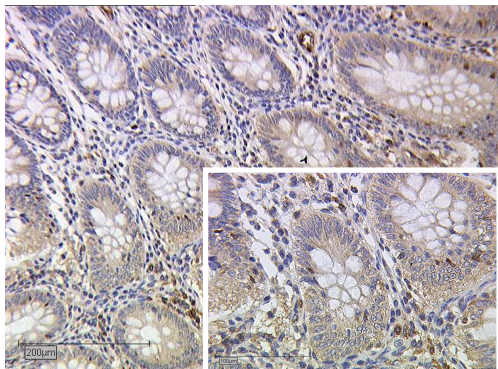


Abbildung 18 IL-8 Expression im Kolon als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

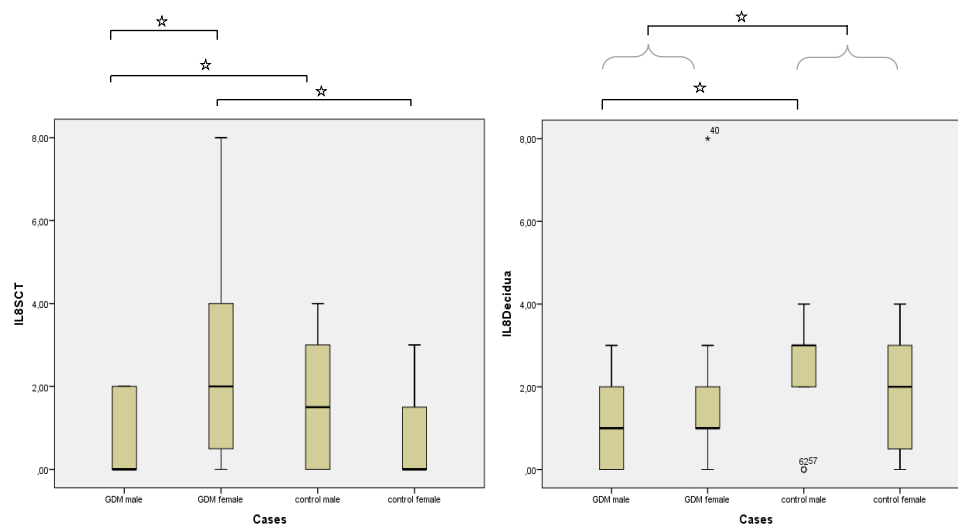


Abbildung 19 Box Plot IL-8, \*  $p < 0,05$

### 3.3 Interleukin 15

Analog zu den bereits vorangegangenen Interleukinen konnte auch IL-15 in beiden Gruppen und bei beiden Geschlechtern, sowohl im SCT, als auch im EVT lichtmikroskopisch grundsätzlich nachgewiesen werden. Allerdings ebenfalls in unterschiedlichen Intensitäten.

#### 3.3.1 IL-15 GDM vs. Kontrolle

In unseren Untersuchungen scheint der SCT der GDM positiven Plazenten mehr IL-15 zu exprimieren, als die der Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied zeigte sich allerdings nicht (Median IRS 6 vs. 2;  $p=0,089$ ). Im geschlechtsspezifischen Vergleich der GDM positiven Plazenten mit der Kontrollgruppe zeigte sich bei den weiblichen Feten zwar eine leichte Anhäufung von IL-15 in der gesunden Kontrollgruppe, insgesamt aber ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied (Median IRS 3,5 vs. 6;  $p=0,640$ ).

Bei den männlichen Nachkommen hingegen zeigte sich das umgekehrte Bild, hier war eine erhöhte Menge an IL-15 im SCT der GDM positiven Plazenten im Vergleich zur Kontrolle zu sehen, der Unterschied ist hier als statistisch hochsignifikant anzusehen (Median IRS 6 vs. 2;  $p=0,001$ ).

In der Untersuchung des EVT zeigten sich im Gesamtvergleich der Gruppen ebenfalls erhöhte Werte von IL-15 in den GDM positiven Plazenten im Vergleich zur Kontrollgruppe, hier sind die Unterschiede der Messwerte jedoch als signifikant anzusehen (Median IRS 6 vs. 2;  $p=0,012$ ). Analog zeigte sich auch hier ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich der männlichen GDM-Gruppe zu der Kontrollgruppe, mit einer erhöhten Expression von IL-15 im EVT der GDM positiven Plazenten (Median IRS 6 vs. 1;  $p=0,000$ ).

In der weiblichen Gruppe zeigt sich hingegen kaum ein Unterschied (Median IRS 3 vs. 2;  $p=0,863$ ).

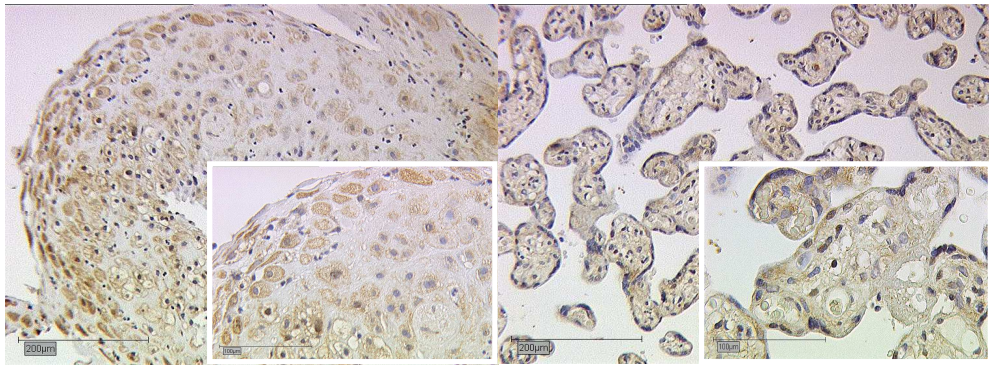
Im Gesamtvergleich zeigte sich auch bei IL-15 eine starke Korrelation in der Expression zwischen SCT und EVT ( $r=0,732$ ;  $p=0,000$ ).

### 3.3.2 IL-15 weiblich vs. männlich

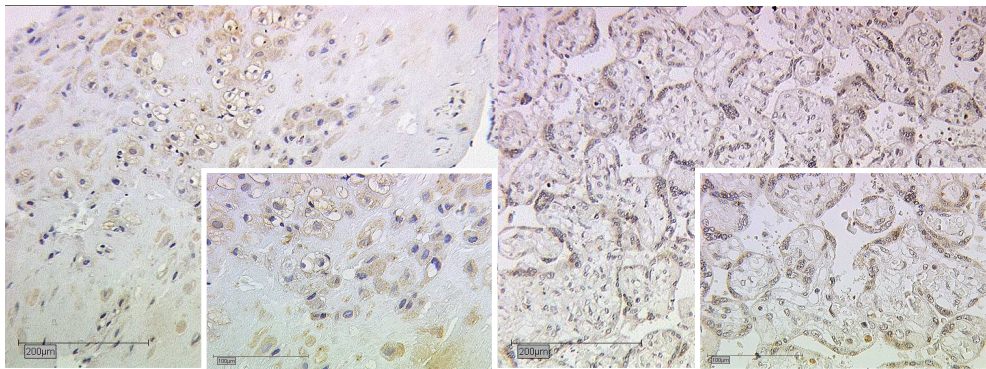
Im direkten Vergleich des SCT der männlichen und weiblichen GDM-Gruppe konnte trotz der scheinbar vermehrten Expression in den männlichen Plazenten, kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Median IRS 6 vs. 3,5;  $p=0,183$ ) Wohingegen sich im Vergleich der geschlechtsspezifischen Kontrollgruppen ein signifikanter Unterschied zeigte. Hier war allerdings in der weiblichen Kontrollgruppe vermehrt IL-15 nachweisbar (Median IRS 2 vs. 6;  $p=0,005$ ).

Auch die gewonnenen Ergebnisse im EVT zwischen der männlichen und weiblichen Kontrollgruppe unterscheiden sich kaum. (Median IRS 1 vs. 2;  $p=0,123$ ). Im Vergleich der beiden GDM-Gruppen zeigte sich allerdings ein signifikant erhöhtes Expressionsmuster in den männlichen Plazenten (Median IRS 6 vs. 3;  $p=0,024$ )

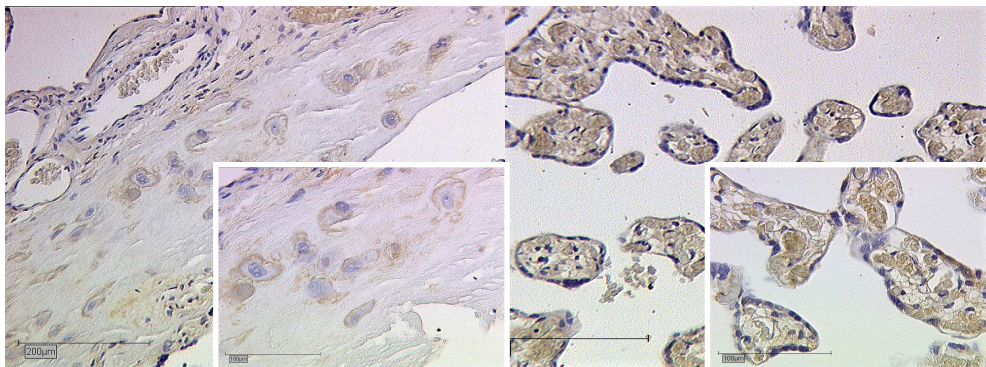




*Abbildung 20 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 21 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*



*Abbildung 22 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung*

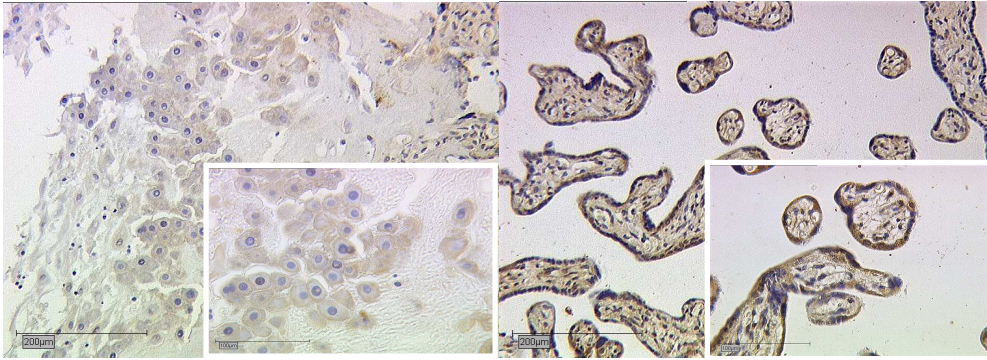


Abbildung 23 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

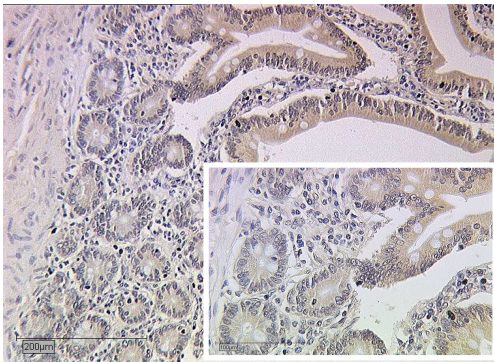


Abbildung 24 IL-15 Expression im Duodenum als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung

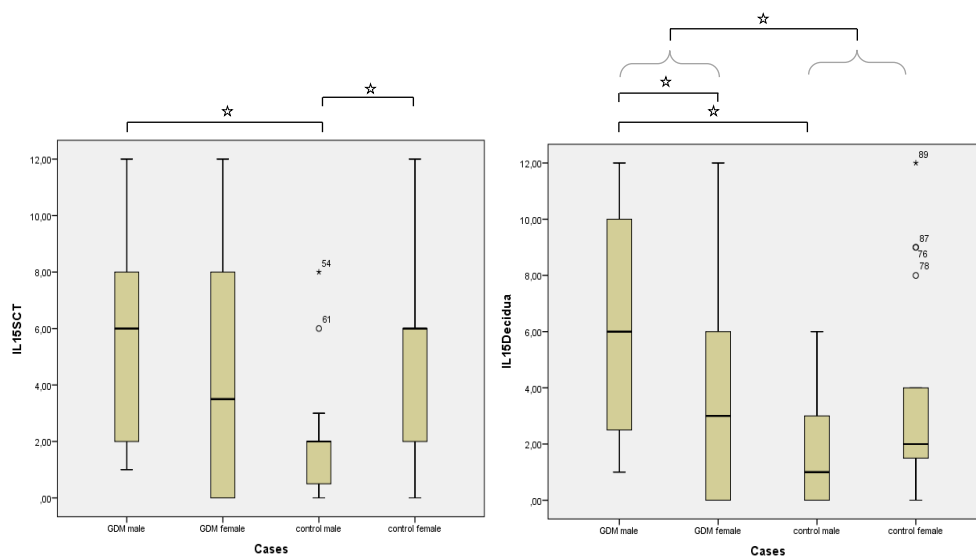


Abbildung 25 Box Plot IL-15, \* $p < 0,05$



### 3.4 Immunfluoreszenz

Die Doppelfärbung mittels Immunfluoreszenz diente dem simultanen Nachweis der jeweiligen Interleukine und dem humanen Leukozyten Antigen (HLA-G). Die Expression von HLA-G ist charakteristisch für die Zellen des EVT und bestätigt somit die richtige Zuordnung der jeweiligen Gewebeabschnitte in den Präparaten und die Zellen des EVT als Interleukin 7, 8 und 15 exprimierende Zellen.

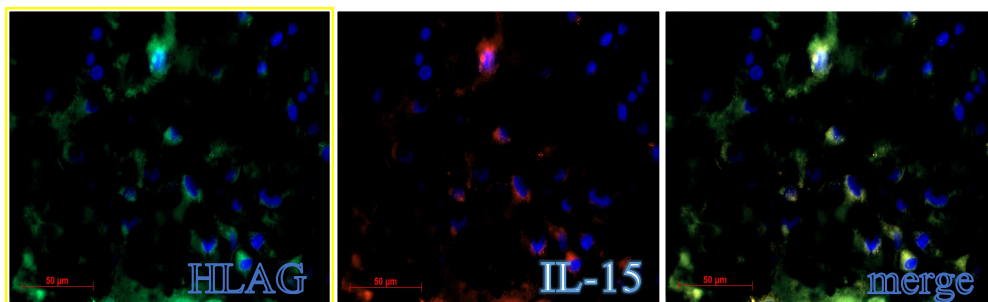


Abbildung 26 Immunfluoreszenz in 63x Vergrößerung; der FITC markierte HLA-G-Ak fluoresziert grün; der Cy 3 markierte IL-15-Ak fluoresziert rot; DAPI als Kernfärbung fluoresziert blau ; merge entspricht der simultanen Darstellung der drei Farbkanäle

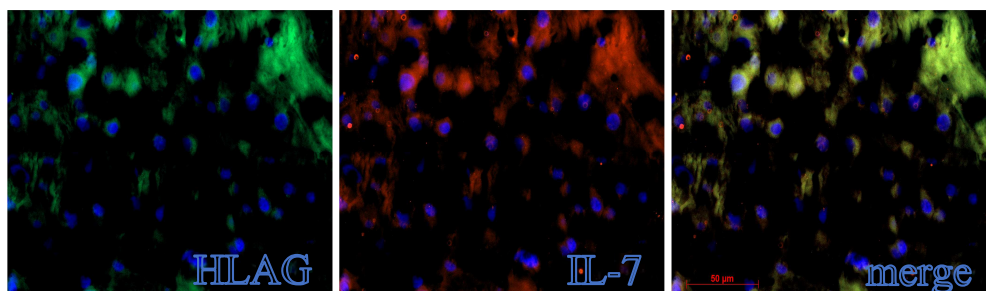


Abbildung 27 Immunfluoreszenz in 63x Vergrößerung; der FITC markierte HLA-G-Ak fluoresziert grün; der Cy 3 markierte IL-7-Ak fluoresziert rot; DAPI als Kernfärbung fluoresziert blau

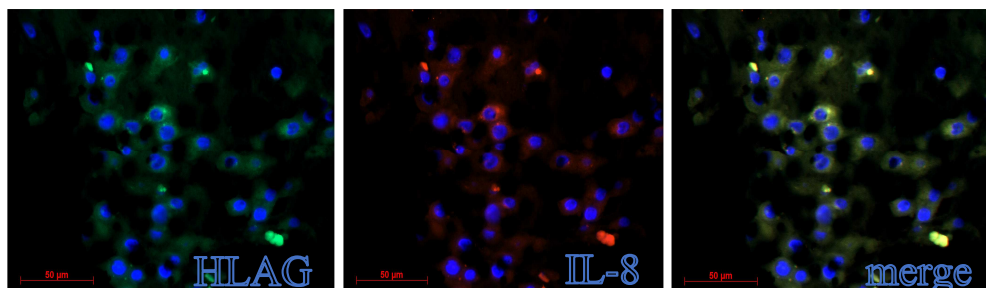


Abbildung 28 Immunfluoreszenz in 63x Vergrößerung; der FITC markierte HLA-G-Ak fluoresziert grün; der Cy 3 markierte IL-8-Ak fluoresziert rot; DAPI als Kernfärbung fluoresziert blau



### 3.5 Zusammenfassung Ergebnisse

Insgesamt konnten die IL-7, -8 und -15 mittels unseres Verfahrens der Immunhistochemie in allen Gruppen grundsätzlich lichtmikroskopisch, sowie in der Immunfluoreszenz detektiert werden, wenn auch in unterschiedlichen Intensitäten.

Sowohl für IL-7, als auch IL-15 konnte gezeigt werden, dass die Expression im EVT im Falle eines GDM erhöht ist. Interessanterweise zeigte sich für IL-8 im EVT das gegenteilige Ergebnis. Hier ist die Expression in der Plazenta aus einer nicht von GDM betroffenen Schwangerschaft erhöht.

Das gleiche Ergebnis gilt für Jungen, bei denen die IL-8 Expression sowohl im SCT, als auch im EVT in der Kontrollgruppe höher als in der GDM-Gruppe war.

Für Mädchen gilt dies allerdings nicht. Im SCT war die IL-8 Expression in der GDM positiven Gruppe höher, als in der Kontrolle. Im EVT zeigte sich bei Mädchen kein Unterschied. Dennoch war das IL-8 auch im EVT der GDM positiven Plazenten von Mädchen im Vergleich zu denen der Jungen erhöht. Im Vergleich der gesunden Kontrollplazenten zeigte sich kein Unterschied. Hier ist also eine geschlechtsspezifische Pathogenese, bzw. ein geschlechtsspezifischer Adaptionsmechanismus anzunehmen.

In der geschlechtsspezifischen Untersuchung des IL-15, konnte lediglich bei den Jungen, sowohl im SCT, als auch im EVT eine erhöhte Expression im Falle eines GDM gefunden werden.

Im Vergleich der beiden Kontrollgruppen zeigte sich hingegen bei Mädchen eine grundsätzlich erhöhte Expression im SCT. Deren Plazenten scheinen also auch ohne das Vorhandensein eines GDM mehr IL-15 zu exprimieren. Im Falle eines GDM scheinen, unseren Untersuchungen zufolge, dann allerdings Jungen vermehrt IL-15 zu exprimieren.

In dem Expressionsmuster von IL-7 zeigten Mädchen bei GDM im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Expression im EVT. Im Gesamtvergleich der GDM-Fälle, so wie der Kontrollen, konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied nachgewiesen werden.

Für alle drei IL gilt insgesamt eine mittlere bis starke positive Korrelation zwischen der Expression im SCT und dem EVT. Das heißt, ist das jeweilige IL im SCT erhöht, gilt dies ebenso für den EVT und umgekehrt.

**IL-7****SCT**

GDMm 10,5	GDMges 9	KOm 6	KOges 8	p=0,398	p=0,056
GDMw 8		KOw 8		p=0,091	
p=0,355		p=0,265			

**EVT**

GDMm 8	GDMges 8	KOm 5	KOges 6	p=0,461	p=0,047*
GDMw 8		KOw 6		p=0,03*	
p=0,708		p=0,204			

**IL-8****SCT**

GDMm 0	GDMges 1	KOm 1,5	KOges 1	p=0,052*	p=0,516
GDMw 2		KOw 0		p=0,008*	
p=0,004*		p=0,091			

**EVT**

GDMm 1	GDMges 1	KOm 3	KOges 2	p=0,000*	p=0,003*
GDMw 1		KOw 2		p=0,531	
p=0,402		p=0,093			

**IL-15****SCT**

GDMm 6	GDMges 6	KOm 2	KOges 2	p=0,001*	p=0,089
GDMw 3,5		KOw 6		p=0,640	
p=0,183		p=0,005*			

**EVT**

GDMm 6	GDMges 6	KOm 1	KOges 2	p=0,000*	p=0,012*
GDMw 3		KOw 2		p=0,863	
p=0,024*		p=0,123			

*Tabelle 7 Zusammenfassung der IRS Mediane der IL-7,-8 und -15, jeweils in SCT und EVT für GDM- und Kontrollgruppe gesamt (in blau), sowie nach Geschlecht sortiert mit dazugehörigem p-Wert. \*signifikant, bei Signifikanzniveau=0,05*

## 4 Diskussion

Es wird bereits seit Langem vermutet, dass die Pathogenese des T2DM und des GDM eine inflammatorische Ursache hat.

Wie eingangs bereits beschrieben, ist Adipositas ein Zustand der low-grade Inflammation, nachgewiesen durch ein erhöhtes Vorkommen von Immunzellen, sowie Entzündungsmarkern im Fettgewebe. Gleichzeitig gilt die inflammatorische Situation als Auslöser der gesteigerten Insulinresistenz und dem daraus folgenden Untergang der pankreatischen  $\beta$ -Zellen.

Es gibt durchaus Parallelen in der Entstehung des T2DM und des GDM. In beiden Fällen spielen eine genetische Prädisposition, sowie ein oben bereits beschriebener ungesunder Lebensstil eine große Rolle, so dass GDM als Prä-Typ-2-Diabetes betrachtet werden kann [6, 114, 115].

Eine Schwangerschaft stellt eine in jeder Hinsicht besondere Situation, im Sinne eines Stresstestes, für den Organismus dar und es ist auffällig, dass die Erstmanifestation einer diabetischen Stoffwechsellage häufig im Rahmen einer Schwangerschaft auftritt. Daher stellt sich die Frage, ob es neben den hormonellen weitere schwangerschaftsspezifische Veränderungen gibt, die die Entwicklung eines Diabetes begünstigen.

Hierbei tritt natürlich die Plazenta, als ausschließlich schwangerschaftsassoziertes Organ, mit einerseits hormonell und inflammatorisch regulierenden Aufgaben und andererseits als einzige direkte Kontaktstelle zwischen Mutter und Fetus in den Fokus des Interesses.

Unser Ziel war es, nachzuprüfen, ob sich der Zustand der Metainflammation im Rahmen eines GDM auch in der Plazenta widerspiegelt. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass es im Rahmen des GDM zu signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster der untersuchten Interleukine 7,8 und 15, sowohl im SCT, als auch im EVT der Plazenta kommt.

Während es bei den Interleukinen 7 und 15 im EVT zu einer signifikanten Erhöhung in der Gruppe der GDM positiven Plazenten kam, zeigte sich bei dem Nachweis von IL 8 im EVT eine signifikant niedrigere Expression in den GDM positiven Plazenten. Darüber hinaus zeigten sich zum Teil geschlechtsspezifische Unterschiede in den Expressionsmustern.

## 4.1 GDM und Inflammation

Eine Schwangerschaft ist beeinflusst durch eine Reihe von Hormonen und Adipokinen, wie Leptin oder Adiponectin und Zytokinen, die sowohl von maternalem Gewebe stammen, als auch von der Plazenta selbst produziert werden [88, 116]. Die zunächst physiologische Insulinresistenz, zur sicheren Versorgung des Fetus, führt zu einer Expansion von pankreatischen  $\beta$ -Zellen und damit einhergehenden massiv erhöhten Insulinsekretion [9]. Aus der zunehmenden Insulinresistenz und dem Funktionsverlust der  $\beta$ -Zellen kann letztlich ein Diabetes entstehen [54]

Diabetes mellitus und damit auch GDM gelten als Zustand einer low-grade bzw. Metainflammation, die sowohl in der Plazenta als auch in der maternalen Zirkulation und im Fettgewebe nachweisbar ist [117]. Es kommt zu einer Ansammlung von aktivierten Makrophagen und proinflammatorischen Zytokinen im Stroma der Plazenta [118, 119].

Um diesen Zusammenhang zwischen GDM und Inflammation vor allem in der Plazenta weiter zu verstehen, führten wir die beschriebenen Untersuchungen durch.

In aktuellen Literaturrecherchen konnte nur eine sehr limitierte Anzahl von Studien gefunden werden, die explizit die von uns untersuchten Chemokine in Bezug auf Diabetes oder GDM untersucht haben.

Eine Vielzahl an Studien legte hierbei vor allem eine Assoziation mit CRP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 nahe.

Wobei noch nicht abschließend geklärt ist, ob IL-6 hierbei förderlich oder hemmend in der Entwicklung einer Insulintoleranz ist. Einerseits sind erhöhte IL-6 Werte, vermutlich vor allem aus Leber- und Fettzellen stammend, in Patienten mit Diabetes mellitus beschrieben [56, 120]. Andererseits ist ein, wohl vor allem durch in der Skelettmuskulatur produziertes IL-6, positiver Effekt auf die Sekretion des glucagon-like-peptide-1 nachgewiesen, welches wiederum die Insulinsekretion und Insulintoleranz verbessert [121, 122].

Da es sich auch bei den von uns untersuchten Chemokinen um proinflammatorische Interleukine handelt, lag der Gedanke nahe, das bereits vorhandene Verständnis der inflammatorischen Situation im Rahmen der Adipositas, des Diabetes und des GDM um diese Faktoren zu erweitern.

### 4.1.1 Insulinresistenz und IL-8

Der Pathomechanismus der Insulinresistenz besteht vermutlich in einem Überfluss an Nährstoffen, wie Glucose und freien Fettsäuren, die auf zellulärer Ebene Stress auf insulin-sensitives Gewebe, wie  $\beta$ -Zellen des Pankreas, Fettgewebe, Leber- und Muskelzellen ausüben. Diese werden hierdurch hypertroph und zur Freisetzung von oben genannten Zytokinen, sowie Chemokinen stimuliert, die ihrerseits TNF- $\alpha$  produzierende Makrophagen rekrutieren und damit die inflammatorische Reaktion aufrecht halten [54].

Die eingangs bereits beschriebenen Amyloidablagerungen im Pankreas, die islet amyloid polypeptide (IAPP), stimulieren laut einer Studie ebenfalls Makrophagen zur IL-1 $\beta$  Sekretion und tragen damit zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei [57].

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Adipositas und einer erhöhten Anzahl von Makrophagen im Fettgewebe, die einen signifikanten Anteil der inflammatorischen Faktoren produzieren [123].

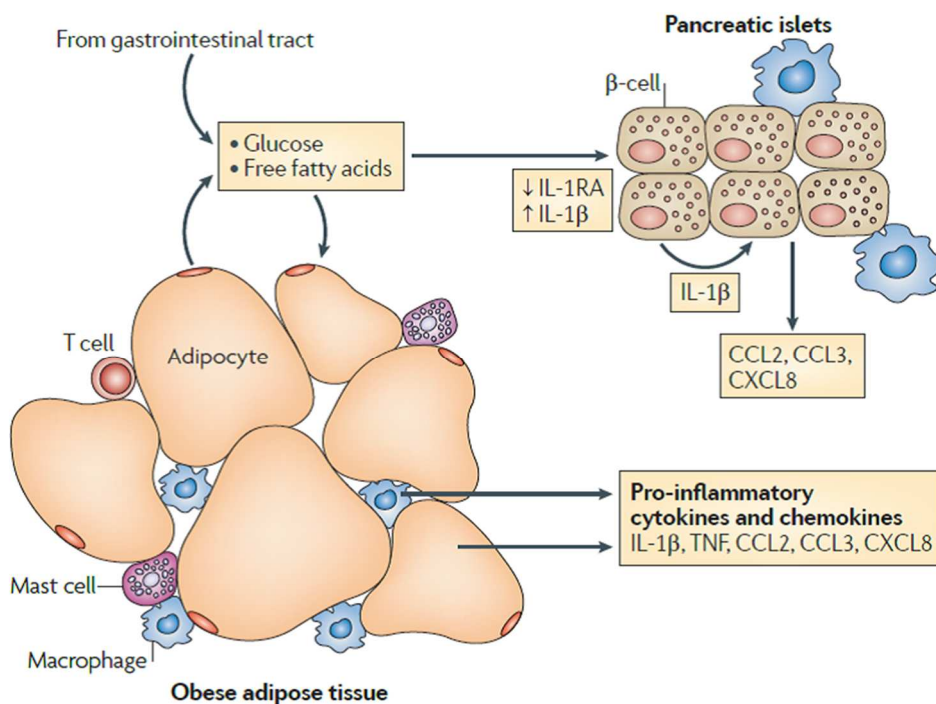


Abbildung 29: Entwicklung der Entzündungsreaktion T2DM [54]

In Abbildung 29 wird gezeigt, wie neben den oben bereits erwähnten Faktoren auch IL 8 (hier CXCL 8) sowohl von durch Nährstoffe und Immunzellen aktivierten pankreatischen Inselzellen, als auch durch Adipozyten sezerniert wird. Diese Erkenntnisse widersprechen unseren Ergebnissen, die vor allem im EVT eine signifikant höhere IL 8 Konzentration in den Plazenten der GDM negativen Gruppe ergaben.

Allerdings muss beachtet werden, dass es sich in der Darstellung um eine Abbildung der Situation im Fettgewebe bei T2DM handelt, unsere Untersuchungen aber ausschließlich an Plazenten durchgeführt wurden.

Der mittlere BMI, als Surrogat-Parameter für Übergewicht, lag in der Kontrollgruppe im Normbereich bei 23,35.

Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen einer älteren Studie, die gezeigt hat, dass es zwar ein erhöhtes Expressionsmuster unter anderem von IL-8 in der Plazenta im Vergleich zu maternalem Fettgewebe gibt, sich aber kein unterschiedliches Muster im Vergleich von GDM positiven mit gesunden Schwangeren zeigt [124]. Dieser Studie nach zu urteilen, muss es also andere Mechanismen geben, die eine erhöhte IL-8 Produktion in der Plazenta begründen und nicht ausschließlich mit einem GDM in Verbindung gebracht werden können. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen GDM und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Unsere Ergebnisse zeigten aber eine erhöhte Expression in den Kontrollplazenten. Die IL-8 Produktion wurde in der genannten Studie in allen untersuchten Geweben (Plazenta, Muskel- und Fettgewebe) durch die Inkubation mit LPS und TNF- $\alpha$ , als Beweis der IL-8 Produktion als Reaktion auf einen inflammatorischen Prozess, gesteigert [124].

In einer aktuellen Studie wiederum konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einem GDM und dem Nachweis von IL-8 in der Plazenta gefunden werden [125]. Inwieweit andere unbekannte Veränderungen in der Schwangerschaft, die nicht in unseren Ausschlusskriterien berücksichtigt werden konnten, Einfluss auf die IL-8 Produktion der Kontrollplazenten hatten, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

In aktuelleren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine erhöhte IL-8 Expression vor allem im Fettgewebe von GDM positiven Müttern erfolgt, in

den Plazenten jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte [126, 127].

Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass freie, in erster Linie gesättigte Fettsäuren die IL 8 Produktion in der Plazenta stimulieren [128], was dem Modell der Pathogenese des GDM entspricht. Analog zu den oben genannten Ergebnissen konnte beobachtet werden, dass es, im Gegensatz zu GDM-Patientinnen, bei gesunden Schwangeren bis zum dritten Trimester zu einem Abfall des im Serum bestimmten IL-8 kommt, um erst postpartal erneut anzusteigen [129]. Eine Erklärung dieser Mechanismen bleibt bisher offen.

#### 4.1.2 Inflammation und IL-7

Unsere Ergebnisse bezüglich des gehäuften Auftretens von IL-7 in der Plazenta bei GDM positiven Müttern sind konform mit den Ergebnissen aus Studien, die gezeigt haben, dass IL-7 in entzündetem Gewebe und Adipozyten unter anderem von Makrophagen sezerniert wird [130] und gleichzeitig über eine Stimulation von Makrophagen ebenfalls die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erhöht und somit als Teil der Pathogenese des GDM und anderer chronischer Entzündungen betrachtet werden muss [130, 131]. Allerdings beziehen sich beide Studien weder auf die Pathologie des GDM, noch diente die Plazenta als Untersuchungsgewebe. Eine aktuelle mexikanische Studie konnte im Plasma von Neugeborenen von übergewichtigen bzw. diabetischen Müttern erhöhte Spiegel an IL-7 nachweisen. Laut dieser Studie ist die Synthese des IL-7 durch erhöhten oxidativen Stress in Form von Abbauprodukten freier Fettsäuren gesteigert [132].

Als makrophagenspezifischer Marker wurde der lösliche Rezeptor sCD163 mit dem Vorkommen von Makrophagen im Fettgewebe und der Entstehung eines T2DM in Verbindung gebracht [133].

Auch die plazentaren Makrophagen weisen den Marker CD163 auf [134] und stehen daher im Verdacht, gleichfalls an der Pathogenese des GDM beteiligt zu sein. Diese Annahme konnte in einer Studie bestätigt werden, die gezeigt hat, dass sowohl die Anzahl CD163 positiver Zellen, als auch die Freisetzung von sCD163 in den Plazenten GDM positiver Mütter im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht war und als positiver Prädiktor eines GDM gilt



[135]. Hier kann also durchaus ein indirekter Einfluss des IL-7 angenommen werden, indem es durch das Zytokin zur Rekrutierung von Makrophagen in der Plazenta kommt.

Passend zu den Funktionen des IL-7 in der Stimulation von T-Lymphozyten, akkumulieren diese ebenfalls neben Makrophagen in adipösem Fettgewebe [136]. Hierbei scheint innerhalb der Gruppe der T-Lymphozyten, zumindest im Mausmodell, eine Differenzierung stattzufinden, wobei CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie T<sub>H</sub>Helper-Zellen 1 (T<sub>H</sub>1) die Insulinresistenz verstärken, wohingegen T<sub>H</sub>2- und T<sub>Regulator</sub>-Zellen dem entgegenwirken [137]. T<sub>Regulator</sub>-Zellen wurden in großer Menge im Fettgewebe gefunden, die Zahl sank aber proportional zum steigenden Übergewicht. Außerdem exprimieren diese Zellen große Mengen des anti-inflammatorisch wirksamen Zytokin IL-10 [137]. Nachdem Gestationsdiabetes gehäuft bei übergewichtigen Schwangeren auftritt, kann hier ein Zusammenhang in der Stimulation von T-Lymphozyten durch IL-7 und damit einer erhöhten Insulinresistenz vermutet werden.

#### 4.1.3 Erfolgreiche Schwangerschaft und IL-15

Unsere Studie ergab eine signifikant erhöhte Konzentration des IL-15 im EVT der Plazenten der GDM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es bisher keine Studie, die explizit IL-15 im Zusammenhang mit GDM untersucht hat. Allerdings lassen sich unsere Ergebnisse mit den bekannten Funktionen des IL-15 und der Theorie der inflammatorischen Pathogenese des GDM vereinbaren.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-15 in den Plazenten sowohl von spontanen, als auch habituellen Aborten im Vergleich zu denen von induzierten Aborten in erhöhter Konzentration nachweisbar ist. Daher besteht die Vermutung, dass das IL-15 in diesem Fall einen bisher nicht vollständig erklärbaren Einfluss auf den Abgang der Schwangerschaft hat [138].

IL-15 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von NK Zellen[102], die wiederum Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  sezernieren[139].

Bei den uterinen NK Zellen(uNK) wird weiter unterschieden zwischen den endometrialen (eNK) und den dezidualen NK(dNK) [140].

Die eNK sind vor und während einer Schwangerschaft im Endometrium der Uterusmukosa nachweisbar und steigen zyklusabhängig zur Sekretionsphase stark an [141]. Die dNK hingegen lassen sich ausschließlich während der Schwangerschaft in der Decidua nachweisen, hierbei sinkt die Zahl allerdings vom ersten zum dritten Trimester stark ab [142]. Die uNK zeigen für sich betrachtet nur ein sehr niedriges Level der für periphere NK Zellen typischen Zytotoxizität [141, 143]. Erst durch die Aktivierung durch IL-15 werden diese Zellen in ihrer Zytotoxizität gesteigert und zur Sezernierung von IFN- $\gamma$  und anderen Entzündungsmediatoren stimuliert [141, 144]. Es wird vermutet, dass die eNK hierbei teilweise als Progenitorzellen für die dNK dienen [140].

Physiologischerweise dienen diese speziellen Formen der NK der Implantation des Embryos und der vaskulären Umbauprozesse für den Erhalt der Schwangerschaft [145], trotzdem lassen diese Vorgänge die Vermutung zu, dass eine erhöhte Konzentration von IL-15 eine Erhöhung der inflammatorisch bedeutsamen Mediatoren zur Folge hat, wie die bereits genannten Einflüsse des IL-15 auf weitere Zelltypen des Immunsystems, wie Makrophagen und dendritische Zellen. Diese werden durch IL-15 zur funktionellen Differenzierung aktiviert [146], zum Ort der Inflammation gelockt und zur Produktion einer Vielzahl weiterer Zytokine, wie IL-8, IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  stimuliert [103, 105]. Diese Mechanismen lassen sich mit unseren Ergebnissen und der These GDM als Zustand der Inflammation zu betrachten vereinbaren.

Nichtsdestotrotz sind zur Validierung dieser These noch weitere Untersuchungen nötig

#### 4.1.4 Insulintoleranz auf zellulärer Ebene

Ein weiterer Teil des angeborenen Immunsystems sind membrangebundene Toll-like Rezeptoren (TLR). Sie reagieren physiologisch auf Wandbestandteile, wie Lipopolysaccharide, bakterieller und viraler Fremdkörper. Sie induzieren inflammatorische Signalwege und die Ausschüttung verschiedener Zytokine.

Es wird ein Zusammenhang zwischen TLR und deren Aktivierung durch Bindung von freien Fettsäuren, im Rahmen eines Überangebotes, postuliert [147].

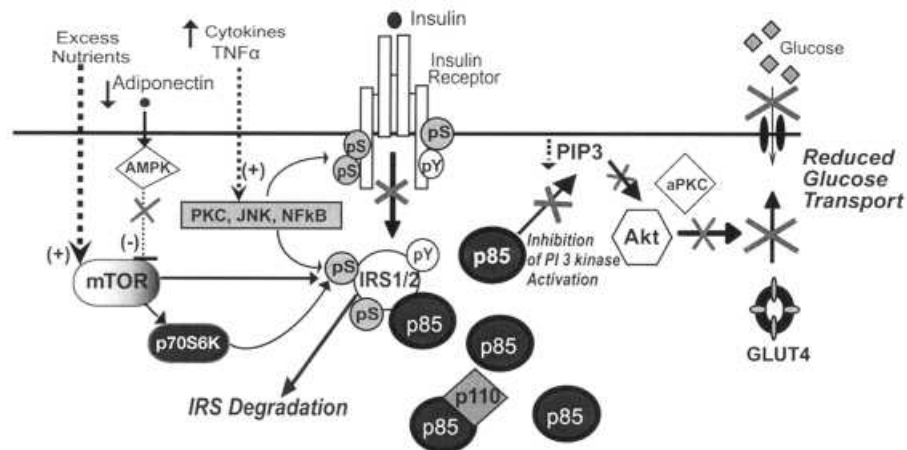
Ein TLR-unabhängiger Mechanismus involviert die Entstehung von reactive oxygen species (ROS), die durch einen gesteigerten Metabolismus freier Fettsäuren entstehen [148].

Alle oben genannten Stimuli, also freie Fettsäuren, ROS, hohe Glucosespiegel, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  selbst induzieren eine Aktivierung des cytosolischen Inflammasoms NLRP3, einem Proteinkomplex in Makrophagen und Granulozyten [149], sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [120]. Der Signalweg über das Inflammasom NLRP3 führt zu einer Aktivierung von Caspasen, die wiederum durch Abspaltung das Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form als IL-1 $\beta$  überführt [150]. Studien konnten außerdem zeigen, dass das von uns untersuchte IL 7 ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [151] und damit auf transkriptioneller Ebene zur vermehrten Synthese von Entzündungsmediatoren, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL 15 führt [152], die ihrerseits die Insulinresistenz weiter verstärken [153].

Des Weiteren führt der NF- $\kappa$ B, wie die JNK intrazellulär zur Serin-Phosphorylierung des Insulinrezeptors sowie des IRS (daher bleibt die aktivierende Tyrosin-Phosphorylierung aus), damit zur Inaktivierung der PI-3-Kinase und über die Inaktivierung von PIP3 zu dem herabgesetzten Einbau von GLUT4 in die Muskelzelle [116].

Obwohl auch die IL 8 Produktion über eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B gesteigert wird [128], zeigte sich in unserer Untersuchung kein erhöhtes IL-8 in den Plazenten der GDM positiven Gesamtgruppe. Lediglich im SCT der GDM positiven Mädchen wurde ein erhöhtes IL-8 nachgewiesen.

Neben dem NF- $\kappa$ B und der JNK existieren weitere inhibitorische Kinasen, wie mTOR und p70S6K, die ebenfalls zu einer Serin-Phosphorylierung am IR und ISR führen und durch ein gesteigertes Nährstoffangebot erhöht werden. Diese Kinasen waren bei GDM-Patientinnen stark erhöht, gelangten postpartal aber wieder auf ihren Normwert [116].



©2007 by American Diabetes Association



Abbildung 30 Zusammenfassung potentieller Mechanismen der Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur während der Spätschwangerschaft bei GDM [116]

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Aktivierung des NF-κB, spielen noch weitere Kernrezeptoren aus der Gruppe der NR4A (nuclear receptor subfamily 4 group A) eine Rolle.

Lappas konnte zeigen, dass die Subtypen NR4A1 und 2, die ebenfalls durch diverse Stimuli, wie z.B. freie Fettsäuren, Wachstums- und Entzündungsfaktoren aktiviert werden, gehäuft in den Plazenten GDM positiver Schwangerschaften nachzuweisen sind. Diese Kernrezeptoren führen ihrerseits wiederum zur erhöhten Produktion von TNF-α, IL-6 und IL-8, sowie zur Amplifizierung des NF-κB Signalwegs[154].

Ein weiterer Faktor in der Pathogenese der Insulintoleranz stellt das Adiponektin dar. Ein von Adipozyten gebildetes Protein, dessen niedrige Plasmawerte mit dem Auftreten von Diabetes korrelieren[155] und in der Spätschwangerschaft deutlich sinken.[156] Es gilt als Insulinsensitizer, da es die Glucoseaufnahme in Muskelzellen erhöht und die Gluconeogenese der Leber senkt [157].

TNF-α und IL-6 hemmen die Transkription von Adiponektin in den Adipozyten [158] über die Herabsetzung des Transkriptionsfaktors PPAR-γ [159].

Diese Herabsetzung führt wiederum zu einer gesteigerten Synthese der Inflam-mationsparameter [160]. Ob weitere Interleukine Einfluss auf die Transkrip-tion von Adiponektin haben, ist derzeit nicht abschließend geklärt.

Eine wichtige Rolle spielen hierbei allerdings epigenetische Einflüsse, also ge-netische Veränderungen, die keinen Einfluss auf die DNA-Sequenz, sondern durch Methylierung an unterschiedlichen Regionen der DNA die jeweiligen Gene ruhigstellen oder aktivieren können [48].

So kommt es im Rahmen der maternalen Hyperglycämie zu einer Hyperme-thylierung am Promoter des Adiponektin-Gens und damit zu einer verminder-ten Expression [49]. Adiponektin wird aus den Adipozyten des Fettgewebes sezerniert, dennoch sind die epigenetischen Veränderungen ebenfalls in der Plazenta nachweisbar. Die Tatsache, dass die Hypermethylierung ebenfalls auf der fetalen Seite der Plazenta nachweisbar ist, spricht für die Glucose als dem zugrunde liegende Ursache, da Glucose im Gegensatz zu Insulin plazentagän-gig ist [49].

Es ist zu beachten, dass der Prozess der Methylierung ein schleichender Vor-gang ist und in steigendem Maße je nach Ausprägung der Insulinresistenz be-reits bei einer gestörten Glucosetoleranz unterhalb der Definitionswerte für ei-nen GDM nachzuweisen ist[49].

## 4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Unsere Ergebnisse weisen auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ex-pression der jeweiligen Zytokine in den Plazenten der GDM Gruppe hin.

In den Kontrollgruppen gab es, außer bei IL-15, keine signifikanten Unter-schiede in den Expressionsmustern zwischen Jungen und Mädchen. Dies spricht einerseits für den generellen Einfluss der Zytokine in der Entstehung des GDM und andererseits für unterschiedliche Mechanismen in der Entwick-lung derselben Erkrankung bzw. der Adaption, abhängig vom Geschlecht des Kindes.

Es ist ein durchaus bekanntes Phänomen, dass das Geschlecht des Fetus Ein-fluss auf den Erfolg bzw. das Outcome der Schwangerschaft bezüglich

schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen, Geburtskomplikationen und des gesundheitlichen Zustandes von Mutter und Kind postpartal hat.

Es hat sich gezeigt, dass hierbei vor allem Schwangerschaften mit männlichen Feten zu einer erhöhten Komplikationsrate neigen [161].

In Untersuchungen von Schwangerschaften, die von Asthma bronchiale, ebenfalls eine chronisch entzündliche Erkrankung, begleitet waren, konnte beobachtet werden, dass bei Verläufen ohne notwendige Kortisontherapie weibliche Feten deutlich kleiner waren, als die männlichen [162]. Kam es allerdings zu akuten Exazerbationen zeigten auch die männlichen Feten Anzeichen einer gestörten Entwicklung, dann allerdings wesentlich schwerer im Sinne einer IUGR (intrauterine growth restriction), Frühgeburtlichkeit oder sogar Totgeburt [163].

Beruhend auf diesen Ergebnissen, wird vermutet, dass männliche und weibliche Feten unterschiedliche Anpassungsstrategien an eine ungünstige intrauterine Umgebung haben. Während männliche Feten Strategien entwickeln, trotz dieser Umstände ausreichend versorgt zu werden, reagieren die weiblichen mit einer Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit, so dass sie weniger Nährstoffe zur Versorgung benötigen. Damit bleiben Mädchen in diesen Fällen insgesamt kleiner, fallen aber noch nicht unter die Definition von IUGR (< 10. Perzentile).

Jungen sind aber aufgrund der mangelnden Anpassung wesentlich gefährdeter bei weiteren Einschränkungen der Versorgung (im o.g. Fall z.B. die Exazerbation) und reagieren dementsprechend empfindlicher [164].

Nicht nur der mütterliche Organismus hat Einfluss auf den Fetus, sondern auch umgekehrt.

So konnte beispielsweise in einer Studie mit Schwangerschaften, die durch eine leichte Form der Präeklampsie erschwert waren, gezeigt werden, dass auch hier die weiblichen Feten mit einer leichten Wachstumsrestriktion reagierten, während die männlichen weiterhin der normalen Größenentwicklung folgten. Es wird vermutet, dass das Wachstum hierbei durch eine periphere Gefäßkonstriktion im maternalen Kreislauf dazu führt, dass der männliche Fetus mit höchster Priorität weiter versorgt wird [165], es aber gleichzeitig zu einer Verschlechterung der Symptomatik bei der Mutter kommen kann.

Es ist naheliegend, dass diese geschlechtsspezifischen Unterschiede unter anderem auf eine unterschiedliche Expression von Genen, Hormonen und Proteinen durch die Plazenta zurückzuführen sind [164].

Die Pathophysiologie des GDM ist bisher noch nicht zur Gänze verstanden, die bisherigen Theorien schlossen allerdings den Fetus als Ursache nicht zwingend mit ein.

Eine groß angelegte kanadische Studie konnte zeigen, dass eine Mutter, die ein männliches Kind austrägt ein höheres Risiko hat in dieser Schwangerschaft an einem GDM zu erkranken, als die mit einem weiblichen [166].

Das Gesamtrisiko einer anschließenden Progression aus dem GDM in einen T2DM ist allerdings im Falle eines Mädchens größer.

Es wird vermutet, dass männliche Feten unmittelbar Einfluss auf den Metabolismus der Mutter nehmen, während im Falle eines GDM bei weiblichen Feten vermutlich bereits präkonzeptionell eine eingeschränkte  $\beta$ -Zellfunktion bestanden hat und das Lebenszeit-Risiko an einem T2DM zu erkranken für die Mutter auch unabhängig einer Schwangerschaft bereits höher einzustufen war [167]. Daraus ergeben sich Hinweise auf eine Form des bidirektionalen Zwischenspiels zwischen Mutter und Kind [168].

Diese Aussage kann für unsere Studienpopulation weder bestätigt, noch widerlegt werden.

In den von uns untersuchten Gruppen der Mädchen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der GDM Gruppe und den Kontrollplazenten. Im EVT der GDM-Plazenten zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des IL-7, sowie im SCT eine Erhöhung des IL-8.

Bei den Jungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des IL-7. IL-8 wird sowohl im SCT, als auch im EVT vermehrt sezerniert, allerdings ebenso wie im Gesamtvergleich GDM vs. Kontrolle vermehrt in den Kontrollplazenten. Lediglich das IL-15 lässt sich sowohl im SCT, als auch im EVT erhöht in den Plazenten von Jungen aus der GDM-Gruppe nachweisen. Im Gesamtvergleich der GDM Plazenten der Mädchen mit denen der Jungen ergaben sich lediglich für die Expression von IL-8 im SCT und von IL-15 im EVT signifikante Unterschiede.

Das IL-8 wurde im Falle eines GDM im SCT von Plazenten weiblicher Feten signifikant mehr exprimiert, als in denen von männlichen Plazenten.

Im Falle des IL-15 verhält es sich umgekehrt. Im EVT männlicher Feten wurde signifikant mehr IL-15 nachgewiesen, als in denen der weiblichen.

Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es keine entsprechenden Studien, mit denen unsere Ergebnisse unmittelbar zu vergleichen wären. Eine endgültige Erklärung der geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Expressionsmuster bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Falle der Schwangerschaften asthmatischer Mütter zeigte sich, bis auf das IL-8, das gegenteilige Bild. Die untersuchten Entzündungsparameter TNF- $\alpha$ , sowie die IL-1 $\beta$ , 5, 6 und 8 waren nur in den Plazenten der Mädchen erhöht nachweisbar. Bei den Jungen veränderte sich die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht [169].

Generell scheint es einen Unterschied in der immunologischen Funktion zwischen den Geschlechtern zu geben, die insgesamt im weiblichen Organismus aktiver in der Entzündungshemmung zu sein scheint, als im männlichen.

Als Beispiel dienen hier unter anderem die höhere Wahrscheinlichkeit einer infizierten Plazenta bei frühgeborenen Jungen, als bei frühgeborenen Mädchen [170].

Studien konnten außerdem zeigen, dass immunassoziierte Gene, wie die für die JAK1, IL2RB (IL-2 Rezeptor), CXCL1, IL1RL1 (IL-1 Rezeptor) und den TNF Rezeptor in weiblichen Plazenten in wesentlich höheren Konzentrationen exprimiert wurden [171].

Diese Ergebnisse konnten für die in unserer Studie untersuchten Interleukine nicht eindeutig gezeigt werden. Das IL-7 zeigte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, das IL-8 ist bei Mädchen mit GDM erhöht, während das IL-15 bei den Jungen mit GDM erhöht ist, im Vergleich der gesunden Plazenten aber erniedrigt.

Allgemein gelten Mädchen grundsätzlich als insulinresistenter als Jungen [172]. Mädchen kommen mit einem geringeren Geburtsgewicht auf die Welt, weisen dabei aber einen höheren Spiegel an Insulin und Pro-Insulin auf, was auf eine intrinsisch erhöhte Insulinresistenz hinweist [173].



Dieser Unterschied wurde ebenfalls bei Kindern aus diabetischen Schwangerschaften gefunden [174].

Auch im weiteren Lebensverlauf bleibt dieser geschlechtsspezifische Unterschied bestehen. Mädchen haben in allen Altersgruppen einen erhöhten Nüchterninsulinspiegel, auch nach der Korrektur für Einflussfaktoren wie Übergewicht oder pubertärer Entwicklungsstand [175].

Genauso erweisen sich Frauen im Erwachsenenalter um 25% mehr insulinresistent als Männer, nach Adjustierung des Bauchumfangs, der als Surrogat-Marker für das viszerale Fett steht, welches wiederum als Risikofaktor des T2DM gilt [176]. Wird allerdings der intrahepatische Fettanteil als Insulin-assoziiierter Marker betrachtet, ergeben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Insulinresistenz im Erwachsenenalter [177].

Diesen Studienergebnissen nach zu urteilen, wäre in unserer Studie, die die Theorie des GDM als inflammatorische Erkrankung als Grundlage betrachtet, ein umgekehrtes Ergebnis zu erwarten gewesen, nämlich die erhöhte Expression der IL in den Plazenten der weiblichen GDM Gruppe.

Es stellt sich also die Frage, ob einem GDM letztlich andere Pathomechanismen zugrunde liegen oder, ob die inflammatorische Reaktion eher im maternalen Organismus, also Fett- oder Muskelgewebe nachweisbar ist.

Um diese Frage abschließend zu beantworten, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Gestationsdiabetes ist eine Glucosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mittels eines oralen Glucosetoleranztestes diagnostiziert wird. Die Prävalenz in Deutschland liegt derzeit bei ca. 5,38% mit steigender Tendenz.

Es drohen zum Teil gravierende kurzfristige, wie langfristige gesundheitliche Folgen, sowohl für Mutter, als auch Kind.

Ein gewisser Grad der Insulinresistenz während der Schwangerschaft gehört zu den physiologischen Mechanismen zur Gewährleistung einer optimalen Versorgung des Ungeborenen. Eine pathologische Entgleisung dieser Insulinresistenz aber zeigt durchaus Parallelen zum Erscheinungsbild des Diabetes mellitus.

Studien konnten bereits belegen, dass inflammatorische Mechanismen die Pathogenese eines Diabetes mellitus beeinflussen. Ziel unserer Studie war es Parallelen in der Pathogenese des GDM und des DM als inflammatorisch beeinflusste Erkrankung aufzudecken.

Als ausschließlich schwangerschaftsassoziertes Organ und der Verbindungsstelle der Organismen von Mutter und Kind im Sinne der feto-maternalen-Grenze diente uns die Plazenta als Untersuchungsobjekt.

Hierzu untersuchten wir die Plazenten von insgesamt 80 graviden Frauen. Bei 40 dieser Studienteilnehmerinnen ergab sich im Laufe der Schwangerschaft die Diagnose eines GDM. Sowohl die GDM-, als auch die Kontrollgruppe wurden jeweils nach Geschlecht des Kindes in 2 Gruppen á 20 Teilnehmerinnen unterteilt.

Mittels immunhistochemischer Färbung erbrachten wir den Nachweis der Expression von IL-7, -8 und -15 sowohl im SCT, als auch im EVT der Plazentapräparate. Durch die Doppelimmunfluoreszenz wurden die Ergebnisse bestätigt und in den entsprechenden Teilen der Plazenta lokalisiert.

Wir konnten jedes der drei Interleukine grundsätzlich in der Plazenta nachweisen, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten.

Es zeigte sich, dass sowohl IL-7, als auch IL-15 im Falle eines GDM in der Plazenta signifikant erhöht ist, wenn auch nur im EVT.

IL-8 hingegen war in unserer Studie im EVT der GDM-Plazenten signifikant erniedrigt. In der Betrachtung der Mädchengruppe isoliert zeigte sich hingegen eine Erhöhung des IL-8, wenn auch im SCT. Bei den Jungen ergab sich im EVT, wie im SCT erneut eine Erniedrigung der Expression.

Analog dazu haben Mädchen im Gesamtvergleich der GDM-Gruppen eine erhöhte Expression im SCT. Für den EVT, wie für den Vergleich der gesunden Kontrollgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Für das IL-7 zeigte sich im Gesamtvergleich der Jungen und Mädchen, weder in der Fall- noch in der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied.

Die Expression des IL-15 zeigte bereits im Fall-Kontroll-Vergleich der Mädchen und Jungen getrennt unterschiedliche Ergebnisse.

Während die Mädchen kein unterschiedliches Expressionsverhalten zeigten, ergab sich für die Jungen sowohl im SCT, als auch im EVT ein signifikant höherer Nachweis von IL-15 im Falle eines GDM. Demzufolge ergaben sich auch im Gesamtvergleich der GDM-Gruppen eine erhöhte Expression im EVT der Jungen.

Im Vergleich der gesunden Plazenten hingegen, ergab sich im SCT der Mädchen eine höhere Expression.

Unseren Ergebnissen zufolge scheinen Interleukine, wie bei einem Diabetes mellitus, auch in der Pathogenese des GDM eine Rolle zu spielen. Allerdings folgen die Ergebnisse nicht konsequent der Inflammationstheorie des Diabetes mellitus.

Warum, entgegen der Vermutung, IL-8 im Falle eines GDM sinkt, was genau den geschlechtsspezifischen Unterschied bedingt und warum er zwischen den IL variiert, sowie die Frage des Expressionsortes (SCT vs. EVT) bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Letztlich bleibt allgemein die Frage offen, ob die immunmodulatorischen Veränderungen in der Plazenta als Ursache oder Folge eines GDM betrachtet werden müssen.

Wir konnten mit dieser Studie einen Beitrag zur wichtigen Grundlagenforschung der Pathogenese des GDM, sowie des geschlechtsspezifischen Entstehungsprozesses bzw. der Adaption an pathologische Mechanismen, leisten. Die Forschung auf diesem Gebiet ist bei weitem noch nicht abgeschlossen und birgt ein großes Potential weitreichender Veränderungen in der Primär- und Sekundärprävention des GDM und DM. Bei einer immunologisch induzierten Erkrankung hätte dies beispielsweise ein Umdenken im medikamentösen Behandlungsplan bzw. der kausalen Therapie zur Folge.

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
Ag	Antigene
Ak	Antikörper
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CT	Zytotrophoblast
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zellen
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
dNK	Deziduale natürliche Killerzellen
EVT	Extravillöser Trophoblast (Dezidua)
EVT	Extravillöser Trophoblast
g; kg	Gramm; Kilogramm
GCT	Glucose Challenge Test
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GLUT	Glucosetransporter
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff, Protonen
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome study
Hb	Hämoglobin
hCG	Humanes Choriongonadotropin
hCT	Humanes Chorionthyreotropin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hPGH	Humanes plazentäres Wachstumshormon
hPL	Humanes Plazentalaktogen

IADPSG	International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IL-15R	Interleukin 15 Rezeptor
IR	Insulinrezeptor
IRS	Immunoreaktiver Score
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK	Januskinase
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilo-Dalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml; dl	Milliliter; Deziliter
Na <sup>+</sup>	Natrium
NF-κB	Nuclear factor κ B
O <sub>2</sub>	Dioxid, Sauerstoff
oGTT	Oraler Glucosetoleranztest
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered saline
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-Triphosphat
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
r	Spearman Rho Korrelationskoeffizient
Rh	Rhesusfaktor
ROS	Reactive oxygen species
RR	Blutdruckmessung nach Riva Rocci
SCT	Synzytiotrophoblast
SSW	Schwangerschaftswoche

STAT	Signal Transducer and activator of Transcription
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
WHO	World Health Organisation

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeit des GDM/DM Typ 1 und 2 in % in Deutschland 2002-2016.....	2
Abbildung 2: Absolute Häufigkeiten GDM/DM Typ 1 und 2 in Deutschland 2002-2016.....	3
Abbildung 3: Flussdiagramm bei erhöhten Blutglucosewerten in der Frühschwangerschaft.....	5
Abbildung 4: Flussdiagramm Diagnostik Hyperglycämie in der Schwangerschaft .....	6
Abbildung 5: Vergleich Charakteristika assoziiert mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus.....	11
Abbildung 6: Aufbau einer reifen Plazenta.....	15
Abbildung 7: ABC Methode, mit Primär-Ak, biotinyliertem Brücken-Ak und ABC-Komplex .....	26
Abbildung 8 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	35
Abbildung 9 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	35
Abbildung 10 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung.....	35
Abbildung 11 IL-7 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung.....	36
Abbildung 12 IL-7 Expression im Kolon als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	36
Abbildung 13 Box-Plot IL-7 .....	36
Abbildung 14 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	39
Abbildung 15 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	39
Abbildung 16 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung.....	39
Abbildung 17 IL-8 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung.....	40



Abbildung 18 IL-8 Expression im Kolon als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	40
Abbildung 19 Box Plot IL-8.....	40
Abbildung 20 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	43
Abbildung 21 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen GDM Plazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	43
Abbildung 22 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in männlichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	43
Abbildung 23 IL-15 Expression im EVT (li) und im SCT (re) in weiblichen Kontrollplazenten, jeweils in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	44
Abbildung 24 IL-15 Expression im Duodenum als Positivkontrolle, in 10- bzw. 25-facher Vergrößerung .....	44
Abbildung 25 Box Plot IL-15.....	44
Abbildung 26 Immunfluoreszenz IL-15.....	45
Abbildung 27 Immunfluoreszenz IL-7.....	45
Abbildung 28 Immunfluoreszenz IL-8.....	45
Abbildung 29: Entwicklung der Entzündungsreaktion T2DM .....	51
Abbildung 30 Zusammenfassung potentieller Mechanismen der Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur während der Spätschwangerschaft bei GDM.....	57

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Empfohlener Bereich der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft.....	13
Tabelle 2: Klinische Kriterien der Studienteilnehmerinnen.....	24
Tabelle 3: Positivkontrollen der jeweiligen Antikörper .....	27
Tabelle 4: Verwendete Geräte .....	30
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien .....	31
Tabelle 6: Verwendete Antikörper .....	32
Tabelle 7 Zusammenfassung der IRS Mediane.....	48

## Literaturverzeichnis

1. Kleinwechter, H., et al., *S3 Leitlinie - Gestationsdiabetes mellitus*, D.G.f.G.u.G. Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Editor. 2011.
2. Europa, W.R., *GESUNDHEIT21: Das Rahmenkonzept „Gesundheit für alle“ für die Europäische Region der WHO*, in *Europäische Schriftenreihe*. 1999.
3. Dooley, S.L., B.E. Metzger, and N.H. Cho, *Gestational Diabetes Mellitus: Influence of Race on Disease Prevalence and Perinatal Outcome in a U.S. Population*. Diabetes, 1991. **40**(Supplement 2): p. 25-29.
4. Thorpe, L.E., et al., *Trends and racial/ethnic disparities in gestational diabetes among pregnant women in New York City, 1990-2001*. Am J Public Health, 2005. **95**(9): p. 1536-9.
5. GmbH, A.I.f.a.Q.u.F.i.G., *Bundesauswertung zum Verfahrensjahr 2013 16/1–Geburtshilfe Qualitätsindikatoren*. 07.05.2014 - 24/2014010004.
6. Schaefer-Graf, U., et al., *S3-Leitlinie Gestationsdiabetes (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, D.G.f.G.u.G. Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Editor. 2018.
7. Lain, K.Y. and P.M. Catalano, *Metabolic changes in pregnancy*. Clinical obstetrics and gynecology, 2007. **50**(4): p. 938-948.
8. Catalano, P.M., et al., *Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(4): p. 903-16.
9. Catalano, P.M., *Trying to understand gestational diabetes*. Diabetic Medicine, 2014. **31**(3): p. 273-281.
10. *Änderung der Richtlinien über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung (Mutterschafts-Richtlinien): Einführung eines Screenings auf Gestationsdiabetes*, in *BAnz. Nr. 36 (S. 914) vom 02.03.2012*, B.f. Gesundheit, Editor. 15. Dezember 2011: Berlin.
11. Kleinwechter, H., et al., *Gestational diabetes mellitus (GDM) diagnosis, therapy and follow-up care: Practice Guideline of the German Diabetes Association(DDG) and the German Association for Gynaecology and Obstetrics (DGGG)*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014. **122**(7): p. 395-405.
12. Ostlund, I. and U. Hanson, *Occurrence of gestational diabetes mellitus and the value of different screening indicators for the oral glucose tolerance test*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003. **82**(2): p. 103-8.
13. Diabetes, I.A.o. and P.S.G.C. Panel, *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy*. Diabetes Care, 2010. **33**(3): p. 676-682.
14. Lawrence, J.M., et al., *Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005*. Diabetes Care, 2008. **31**(5): p. 899-904.
15. *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
16. Coustan, D.R., *Management of gestational diabetes mellitus: a self-fulfilling prophecy?* Jama, 1996. **275**(15): p. 1199-200.
17. Bhat, M., et al., *Determinants of gestational diabetes mellitus: A case control study in a district tertiary care hospital in south India*. Int J Diabetes Dev Ctries, 2010. **30**(2): p. 91-6.
18. Yegorov, et al., *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **202**(3): p. 255.e1-7.
19. Rowan, J.A., et al., *Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2003-15.

20. Crowther, C.A., et al., *Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(24): p. 2477-2486.
21. Shand, A.W., et al., *Outcomes of pregnancies in women with pre-gestational diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus; a population-based study in New South Wales, Australia, 1998-2002*. Diabet Med, 2008. **25**(6): p. 708-15.
22. Bellamy, L., et al., *Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet. **373**(9677): p. 1773-1779.
23. Seely, E.W. and C.G. Solomon, *Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2393-8.
24. Anyaegbunam, A.M., S. Scarpelli, and M.S. Mikhail, *Chronic hypertension in gestational diabetes: influence on pregnancy outcome*. Gynecol Obstet Invest, 1995. **39**(3): p. 167-70.
25. Sermer, M., et al., *The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. A preliminary review*. Diabetes Care, 1998. **21 Suppl 2**: p. B33-42.
26. Fadl, H.E., et al., *Maternal and neonatal outcomes and time trends of gestational diabetes mellitus in Sweden from 1991 to 2003*. Diabetic Medicine, 2010. **27**(4): p. 436-441.
27. Buchanan, T.A., et al., *What Is Gestational Diabetes?* Diabetes Care, 2007. **30**(Supplement 2): p. S105-S111.
28. Albareda, M., et al., *Diabetes and Abnormal Glucose Tolerance in Women With Previous Gestational Diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(4): p. 1199-1205.
29. Lauenborg, J., et al., *Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1194-9.
30. Hunger-Dathe, W., et al., *Prevalence of impaired glucose tolerance 6 years after gestational diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006. **114**(1): p. 11-7.
31. Lobner, K., et al., *Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 792-7.
32. Schaefer-Graf, U.M., et al., *Clinical predictors for a high risk for the development of diabetes mellitus in the early puerperium in women with recent gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**(4): p. 751-6.
33. Bartha, J.L., P. Martinez-del-Fresno, and R. Comino-Delgado, *Postpartum metabolism and autoantibody markers in women with gestational diabetes mellitus diagnosed in early pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2001. **184**(5): p. 965-70.
34. Catalano, P.M., E.D. Tyzbit, and E.A. Sims, *Incidence and significance of islet cell antibodies in women with previous gestational diabetes*. Diabetes Care, 1990. **13**(5): p. 478-82.
35. Fuchtenbusch, M., et al., *Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study*. Diabetes, 1997. **46**(9): p. 1459-67.
36. Omori, Y. and L. Jovanovic, *Proposal for the reconsideration of the definition of gestational diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(10): p. 2592-3.
37. Barrett-Connor, E., et al., *Women and heart disease: the role of diabetes and hyperglycemia*. Arch Intern Med, 2004. **164**(9): p. 934-42.
38. Pedersen, J., *Diabetes and pregnancy; blood sugar of newborn infants during fasting and glucose administration*. Ugeskr Laeger, 1952. **114**(21): p. 685.
39. Ethridge, J.K., Jr., P.M. Catalano, and T.P. Waters, *Perinatal outcomes associated with the diagnosis of gestational diabetes made by the international association of the diabetes and pregnancy study groups criteria*. Obstet Gynecol, 2014. **124**(3): p. 571-8.
40. Salvesen, D.R., et al., *Fetal plasma erythropoietin in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **168**(1 Pt 1): p. 88-94.

41. Petry, C.J., *Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment*. British Journal of Nutrition, 2010. **104**(06): p. 775-787.
42. Lechner, A., R. Lohr, and J. Seissler, *Gestationsdiabetes*. Der Internist, 2011. **52**(10): p. 1149-1157.
43. Gewolb, I.H., *Effect of high glucose on fetal lung maturation at different times in gestation*. Exp Lung Res, 1996. **22**(2): p. 201-11.
44. Gilmartin, A.B., S.H. Ural, and J.T. Repke, *Gestational diabetes mellitus*. Rev Obstet Gynecol, 2008. **1**(3): p. 129-34.
45. Hillier, T.A., et al., *Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia*. Diabetes Care, 2007. **30**(9): p. 2287-92.
46. Clausen, T.D., et al., *High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia*. Diabetes Care, 2008. **31**(2): p. 340-6.
47. Claesson, R., A. Aberg, and K. Marsal, *Abnormal fetal growth is associated with gestational diabetes mellitus later in life: population-based register study*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2007. **86**(6): p. 652-6.
48. Maccani, M.A. and C.J. Marsit, *Epigenetics in the placenta*. Am J Reprod Immunol, 2009. **62**(2): p. 78-89.
49. Bouchard, L., et al., *Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration*. Diabetes, 2012. **61**(5): p. 1272-80.
50. Schaefer-Graf, U.M., et al., *Birth Weight and Parental BMI Predict Overweight in Children From Mothers With Gestational Diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(7): p. 1745-1750.
51. Maraschin Jde, F., *Classification of diabetes*. Adv Exp Med Biol, 2012. **771**: p. 12-9.
52. Donath, Marc Y., et al., *Inflammation in Obesity and Diabetes: Islet Dysfunction and Therapeutic Opportunity*. Cell Metabolism, 2013. **17**(6): p. 860-872.
53. Wentworth, J.M., S. Furlanos, and L.C. Harrison, *Reappraising the stereotypes of diabetes in the modern diabetogenic environment*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(9): p. 483-9.
54. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(2): p. 98-107.
55. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. Diabetologia, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
56. Spranger, J., et al., *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 812-7.
57. Masters, S.L., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 897-904.
58. Yin, J., et al., *Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(2): p. E333-42.
59. Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis, *Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6257-63.
60. Franz, M.J., et al., *Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S51-61.
61. Algert, S., P. Shragg, and D.R. Hollingsworth, *Moderate caloric restriction in obese women with gestational diabetes*. Obstet Gynecol, 1985. **65**(4): p. 487-91.

62. Rasmussen, K.M., P.M. Catalano, and A.L. Yaktine, *New guidelines for weight gain during pregnancy: what obstetrician/gynecologists should know*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2009. **21**(6): p. 521-6.
63. Perseghin, G., et al., *Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects*. N Engl J Med, 1996. **335**(18): p. 1357-62.
64. Association, A.D., *Gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S88-90.
65. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Pharmakologie und Toxikologie 2011/Karow Allg. u. Spez. Pharmakologie und Toxikologie/19. Aufl*, 2011.
66. Kitzmiller, J.L., L. Dang-Kilduff, and M.M. Taslimi, *Gestational Diabetes After Delivery: Short-term management and long-term risks*. Diabetes Care, 2007. **30**(Supplement 2): p. S225-S235.
67. Diedrich, K., *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2007: Springer-Verlag.
68. Gude, N.M., et al., *Growth and function of the normal human placenta*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 397-407.
69. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie. 2., komplett überarbeitete Auflage* ed. 2006, Stuttgart, New York; Thieme.
70. Weyerstahl, T. and M. Stauber, *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2013: Georg Thieme Verlag.
71. Loke, Y. and A. King, *Human implantation: cell biology and immunology*. 1995: Cambridge University Press.
72. Stulc, J., *Placental transfer of inorganic ions and water*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 805-36.
73. Yudilevich, D.L. and J.H. Sweiry, *Transport of amino acids in the placenta*. Biochim Biophys Acta, 1985. **822**(2): p. 169-201.
74. Shennan, D.B. and C.A. Boyd, *Ion transport by the placenta: a review of membrane transport systems*. Biochim Biophys Acta, 1987. **906**(3): p. 437-57.
75. Sibley, C.P., et al., *Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger--a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S39-46.
76. Handwerger, S. and M. Freemark, *The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2000. **13**(4): p. 343-56.
77. Beck, P. and W.H. Daughaday, *Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man*. J Clin Invest, 1967. **46**(1): p. 103-10.
78. Barbour, L.A., et al., *Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37489-94.
79. Bajoria, R., et al., *Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface*. Placenta, 2002. **23**(2-3): p. 103-15.
80. Seufert, J., *Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S152-8.
81. Qiu, C., et al., *Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus*. Obstet Gynecol, 2004. **103**(3): p. 519-25.
82. Kumpel, B.M. and M.S. Manoussaka, *Placental immunology and maternal alloimmune responses*. Vox Sanguinis, 2012. **102**(1): p. 2-12.
83. Moffett, A. and C. Loke, *Immunology of placentation in eutherian mammals*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 584-594.
84. Ober, C., et al., *Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study*. Hum Reprod, 1998. **13**(1): p. 33-8.
85. Schmidt, R.F.L.H., *Physiologie des Menschen 30. Auflage*. 2007, Springer Medizin, Heidelberg.

86. Juch, H., et al., *HLA class I expression in the human placenta*. Wiener Medizinische Wochenschrift, 2012. **162**(9-10): p. 196-200.
87. Erlebacher, A., *Immunology of the Maternal-Fetal Interface*. Annual Review of Immunology, 2013. **31**(1): p. 387-411.
88. Hauguel-de Mouzon, S. and M. Guerre-Millo, *The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals*. Placenta, 2006. **27**(8): p. 794-798.
89. Scharrtl, M. and M. Arand, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Vol. 1. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.
90. Rassow, J., et al., *Biochemie. Duale Reihe*. 2008: Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
91. Capitini, C.M., A.A. Chisti, and C.L. Mackall, *Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies*. J Intern Med, 2009. **266**(2): p. 141-53.
92. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
93. Mackall, C.L., T.J. Fry, and R.E. Gress, *Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(5): p. 330-42.
94. Lee, M., et al., *IL-7 receptor deletion ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice*. Diabetologia, 2015. **58**(10): p. 2361-70.
95. Pichert, A., et al., *Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans*. Biomatter, 2012. **2**(3): p. 142-8.
96. Ghasemi, H., et al., *Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review*. Ocul Immunol Inflamm, 2011. **19**(6): p. 401-12.
97. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 122-33.
98. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
99. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
100. Di Sabatino, A., et al., *Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011. **22**(1): p. 19-33.
101. Budagian, V., et al., *IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(4): p. 259-80.
102. Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, *Interleukin 15: biology and relevance to human disease*. Blood, 2001. **97**(1): p. 14-32.
103. Badolato, R., et al., *Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2804-9.
104. Musso, T., et al., *Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3531-9.
105. Alleva, D.G., et al., *IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition*. J Immunol, 1997. **159**(6): p. 2941-51.
106. Perera, P.-Y., et al., *The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use*. Microbes and Infection, 2012. **14**(3): p. 247-261.
107. Park, C.S., et al., *Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6676-83.
108. Wu, T.S., et al., *Reduced expression of Bcl-2 in CD8+ T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 705-12.

109. Knabl, J., et al., *Gestational diabetes mellitus upregulates vitamin D receptor in extravillous trophoblasts and fetoplacental endothelial cells*. Reprod Sci, 2015. **22**(3): p. 358-66.
110. Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen, *Praxis der Immunhistochemie*. 2000: Urban und Fischer.
111. Kuhn, C., *Laborprotokoll IL-8 und IL-7 vom 30.05.2012*
- Laborprotokoll IL-15 vom 07.09.2011, F.I.L. München, Editor. 2012.*
112. Remmele, W. and H. Stegner, *Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-140.
113. Cohen, J., *A power primer*. Psychological Bulletin, Jul 1992. **112**: p. 155-159.
114. Kautzky-Willer, A. and D. Bancher-Todesca, *Endocrine changes in diabetic pregnancy*, in *Diabetology of pregnancy*. 2005, Karger Publishers. p. 18-33.
115. Kleinwechter, H., N. Demandt, and U. Schafer-Graf, *[Predisposition and phenotypes of gestational diabetes]*. Dtsch Med Wochenschr, 2014. **139**(21): p. 1123-6.
116. Barbour, L.A., et al., *Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(Supplement 2): p. S112-S119.
117. Challier, J.C., et al., *Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation and Inflammation in the Placenta*. Placenta, 2008. **29**(3): p. 274-281.
118. Aye, I.L., et al., *Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways*. Biol Reprod, 2014. **90**(6): p. 129.
119. Desoye, G. and S. Hauguel-de Mouzon, *The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network*. Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 2**: p. S120-6.
120. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 183-90.
121. Ellingsgaard, H., et al., *Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1481-9.
122. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis*. J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(2): p. 814-6.
123. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
124. Lappas, M., M. Permezel, and G.E. Rice, *Release of proinflammatory cytokines and 8-isoprostane from placenta, adipose tissue, and skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5627-33.
125. Zhang, J., *Interleukin 6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Inflammation and Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus in Inner Mongolia*. 2017. **23**: p. 4149-57.
126. Kleiblova, P., et al., *Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 150-6.
127. Kuzmicki, M., et al., *The expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in fat and placental tissue from women with gestational diabetes*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(11): p. 841-4.
128. Yang, X., et al., *Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts*. Hum Reprod, 2015. **30**(9): p. 2152-9.



129. Christian, L.M. and K. Porter, *Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: effects of maternal body mass index*. Cytokine, 2014. **70**(2): p. 134-40.
130. Bikker, A., et al., *Interleukin-7: a key mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(16): p. 2347-56.
131. Maury, E., et al., *Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(3): p. E656-65.
132. Hernández-Trejo, M., et al., *Oxidative stress biomarkers and their relationship with cytokine concentrations in overweight/obese pregnant women and their neonates*. BMC Immunol, 2017. **18**.
133. Parkner, T., et al., *Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance*. Diabetologia, 2012. **55**(6): p. 1856-62.
134. Tang, Z., et al., *Glucocorticoids enhance CD163 expression in placental Hofbauer cells*. Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 471-82.
135. Bari, M., et al., *Elevated Soluble CD163 in Gestational Diabetes Mellitus: Secretion from Human Placenta and Adipose Tissue*. PLOS ONE, 2014. **9**(7).
136. Wu, H., et al., *T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 1029-38.
137. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
138. Toth, B., et al., *Placental Interleukin-15 Expression in Recurrent Miscarriage TOTH ET AL. IL-15 AND RECURRENT MISCARRIAGE*. American Journal of Reproductive Immunology, 2010. **64**(6): p. 402-410.
139. De Maria, A., et al., *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 728-32.
140. Manaster, I. and O. Mandelboim, *The unique properties of uterine NK cells*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 434-44.
141. Manaster, I., et al., *Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1869-76.
142. Anne Croy, B., et al., *Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones*. Immunological Reviews, 2006. **214**(1): p. 161-185.
143. Vacca, P., et al., *Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4078-85.
144. Eriksson, M., et al., *Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 667-75.
145. Le Bouteiller, P. and M.P. Piccinni, *Human NK cells in pregnant uterus: why there?* Am J Reprod Immunol, 2008. **59**(5): p. 401-6.
146. Regamey, N., et al., *Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(1): p. 75-84.
147. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
148. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 408-15.
149. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
150. Schroder, K., R. Zhou, and J. Tschopp, *The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?* Science, 2010. **327**(5963): p. 296-300.
151. Li, R., et al., *Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium*. Eur Heart J, 2012. **33**(24): p. 3114-23.

152. Wang, Y., et al., *Stress-activated Dendritic Cells (DC) Induce Dual Interleukin (IL)-15- and IL1beta-mediated Pathways, Which May Elicit CD4+ Memory T Cells and Interferon (IFN)-stimulated Genes*. J Biol Chem, 2015. **290**(25): p. 15595-609.
153. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.
154. Lappas, M., *The NR4A receptors Nurrl and Nur77 are increased in human placenta from women with gestational diabetes*. Placenta, 2014. **35**(11): p. 866-75.
155. Worda, C., et al., *Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(6): p. 2120-4.
156. Catalano, P.M., et al., *Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism*. Diabetologia, 2006. **49**(7): p. 1677-85.
157. Hara, K., T. Yamauchi, and T. Kadowaki, *Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans*. Curr Diab Rep, 2005. **5**(2): p. 136-40.
158. Fasshauer, M., et al., *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(4): p. 1045-50.
159. Zhang, B., et al., *Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1457-66.
160. Knebel, B., et al., *Increased low grade inflammatory serum markers in patients with Polycystic ovary syndrome (PCOS) and their relationship to PPARgamma gene variants*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008. **116**(8): p. 481-6.
161. Di Renzo, G.C., et al., *Does fetal sex affect pregnancy outcome?* Gend Med, 2007. **4**(1): p. 19-30.
162. Murphy, V.E., et al., *Maternal asthma is associated with reduced female fetal growth*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(11): p. 1317-23.
163. Murphy, V.E., et al., *Severe asthma exacerbations during pregnancy*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(5 Pt 1): p. 1046-54.
164. Clifton, V.L., *Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival*. Placenta, 2010. **31**, **Supplement**: p. S33-S39.
165. Stark, M.J., et al., *Alterations in the maternal peripheral microvascular response in pregnancies complicated by preeclampsia and the impact of fetal sex*. J Soc Gynecol Investig, 2006. **13**(8): p. 573-8.
166. Retnakaran, R., et al., *Fetal sex and maternal risk of gestational diabetes mellitus: the impact of having a boy*. Diabetes Care, 2015. **38**(5): p. 844-51.
167. Retnakaran, R. and B.R. Shah, *Fetal Sex and the Natural History of Maternal Risk of Diabetes During and After Pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(7): p. 2574-80.
168. Jaskolka, D., et al., *Sex of the baby and risk of gestational diabetes mellitus in the mother: a systematic review and meta-analysis*. Diabetologia, 2015. **58**(11): p. 2469-75.
169. Scott, N.M., et al., *Placental Cytokine Expression Covaries with Maternal Asthma Severity and Fetal Sex*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(3): p. 1411-1420.
170. Goldenberg, R.L., et al., *The Alabama Preterm Birth Study: intrauterine infection and placental histologic findings in preterm births of males and females less than 32 weeks*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(6): p. 1533-7.
171. Sood, R., et al., *Gene expression patterns in human placenta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5478-83.
172. Shields, B.M., et al., *Measurement of Cord Insulin and Insulin-Related Peptides Suggests That Girls Are More Insulin Resistant Than Boys at Birth*. Diabetes Care, 2007. **30**(10): p. 2661-2666.

173. Wilkin, T.J. and M.J. Murphy, *The gender insulin hypothesis: why girls are born lighter than boys, and the implications for insulin resistance*. Int J Obes (Lond), 2006. **30**(7): p. 1056-61.
174. Lindsay, R.S., et al., *Insulin and insulin propeptides at birth in offspring of diabetic mothers*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1664-71.
175. Travers, S.H., et al., *Gender and Tanner stage differences in body composition and insulin sensitivity in early pubertal children*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(1): p. 172-8.
176. Voss, L.D., et al., *Preventable factors in childhood that lead to insulin resistance, diabetes mellitus and the metabolic syndrome: the EarlyBird diabetes study 1*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003. **16**(9): p. 1211-24.
177. Westerbacka, J., et al., *Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1360-9.
178. Dudley, D.J., et al., *Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor*. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 1996. **3**(6): p. 328-335.

## **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für die Überlassung des Themas bedanken. Er hatte stets eine offene Tür, sowie ein offenes Ohr für noch so triviale Fragen und Probleme. Ich bin mir bewusst, dass dies keine Selbstverständlichkeit ist und weiß es sehr zu schätzen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Stefan Hutter, der trotz des eigenen Arbeitsalltages immer die Zeit gefunden hat, sich mit meinen Belangen auseinanderzusetzen und jeden Schritt mitbegleitet hat.

Ein ebenso großes Dankeschön gilt den Mitarbeiterinnen des Labors, Christina Kuhn und Simone Hoffmann, die nicht müde werden, Doktoranden mit Kompetenz und Geduld in die Welt der Immunhistochemie und wissenschaftlichen Arbeit einzuführen. Mit ihrer freundlichen Art sorgen sie allzeit für gute Stimmung, was die Arbeit immens erleichtert.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Ursula Pritz, ohne die das Studium, die Dissertation und im Grunde genommen alles nicht möglich gewesen wäre. Meinem Bruder Thomas danke ich insbesondere für den technischen Support. Christian danke ich dafür, dass er immer an meiner Seite war.

Ein Dank gilt auch meinen Freunden, für zahllose Gespräche und Motivationen, schier endlose gemeinsame Stunden in der Bibliothek und unzählbar viele gemeinsame Kaffees zur Geistesbelebung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Sophia Pritz

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchung zur Expression von IL-7, IL-8 und IL-15 an der Plazenta bei Gestationsdiabetes**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Sophia Pritz

München, den 17.10.2020